

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CROISSANCE ET TOXINOGENÈSE

(PREMIER MÉMOIRE)

par M. RAYNAUD, A. TURPIN, R. MANGALO et B. BIZZINI (*)
(avec la collaboration technique de R. PÉRY),

(*Institut Pasteur, Annexe de Garches. Service des Anaérobies.*)

INTRODUCTION.

On sait qu'il est classique de classer les toxines microbiennes en deux groupes, les exotoxines et les endotoxines. Nous avons, après d'autres auteurs, montré, par des arguments expérimentaux sur lesquels nous reviendrons plus loin, que la distinction entre ces deux groupes de toxines, distinction qui reste valable à certains points de vue, ne doit pas être basée sur leur liaison avec les corps microbiens mais sur leur nature chimique. Nous proposons donc la classification suivante :

1° *Toxines de structure chimique complexe de type Polyoside-Protéine-Lipide* [1, 1 bis] ou *Glucido-Lipidique* [2, 3, 4]. — Ces toxines représentent une partie constitutive souvent importante, jusqu'à 10 p. 100, du corps microbien. Elles ont été identifiées aux antigènes O complets des formes smooth des Entérobactéries par Boivin [2, 3] et Topley et Raistrick [5]. Une d'entre elles est très probablement l'antigène rough de ces Salmonelles [6, 7].

Pour une souche donnée, la quantité de toxine synthétisée reste

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juillet 1954.

au cours de la croissance proportionnelle à la quantité de matière vivante formée. On ne voit jamais la quantité de toxine augmenter lorsque la croissance est terminée et la synthèse de la toxine ne peut être dissociée de celle de la cellule entière. Nous ne nous occuperons pas de ces toxines au cours de cet exposé.

2° Nous proposons le terme de *toxines holoprotéiques* ou plus simplement de *toxines protéiques* pour le deuxième groupe de toxines correspondant approximativement au groupe ancien des exotoxines.

Leur nature protéique sans groupement prosthétique décelable est établie pour certaines d'entre elles obtenues à l'état de grande pureté : toxine diphtérique [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14] ; toxines botuliniques A et B [15, 16, 17, 18, 19] ; toxine tétanique [20, 21] ; neurotoxine Shiga [22, 23].

Elle est très vraisemblable pour une série d'autres toxines obtenues sinon à l'état pur, du moins sous forme de préparations très purifiées :

Toxine *perfringens* α [24, 25] ; toxine staphylococcique α [26, 27] ; toxine de *Cl. histolyticum* [28].

On peut admettre la nature protéique, par voie d'analogie, des toxines de *Cl. chauvœi*, *Cl. hemolyticum*, *Cl. œdematiens*.

Si la nature protéique de toutes ces toxines explique la plupart de leurs propriétés générales, elle ne préjuge nullement de leur localisation par rapport aux corps microbiens. On peut, en fait, rencontrer les trois éventualités suivantes :

a) La toxine est un constituant du corps microbien qui lui est solidement lié et qui ne diffuse dans le milieu de culture que tardivement à la faveur d'un processus d'autolyse. On ne peut la préparer en quantité appréciable qu'à partir des corps microbiens. Elle ne diffuse pratiquement pas dans le milieu au cours de la phase exponentielle de la croissance. La seule toxine actuellement bien étudiée qui corresponde à ce schéma est la neurotoxine Shiga.

Il est probable, à notre avis, que les recherches ultérieures permettront de découvrir de nouvelles toxines protéiques qui rentreront dans ce cadre. Il paraît bien en être ainsi de la toxine pesteuse d'après les résultats de Ajl et coll. [29, 30].

La toxine, dans ces cas, est un constituant endocellulaire fortement lié à la cellule. La quantité de toxine synthétisée semble bien, pour une souche donnée, être proportionnelle à la masse microbienne totale formée. Elle ne représente d'ailleurs, dans le cas de *Shigella shigæ*, qu'une fraction très faible de ce dernier.

b) La toxine est diffusée dans le milieu de culture au cours même de la phase exponentielle. La concentration de la toxine dans les corps microbiens reste faible. Quoique non nulle, la quantité totale de toxine endocellulaire est négligeable par rapport à la quantité de toxine présente dans le milieu extérieur. (La

quantité totale de toxine extractible à partir des corps microbiens est inférieure à 1 p. 100 de la toxine totale.)

Cette éventualité est celle qui était acceptée jusqu'à ces dernières années par la majorité des bactériologistes ; d'où le nom d'exotoxines réservé par eux à l'ensemble des toxines protéiques (auxquelles se rattachait comme une exception la neurotoxine *Shiga*).

Nous pensons que certaines toxines protéiques rentrent effectivement dans ce groupe. Nous avons pu l'établir pour trois toxines importantes :

Toxine diphtérique [31], toxine staphylococcique α [32], toxine *perfringens* α [33].

c) La toxine est diffusée dans le milieu extérieur au cours de la phase exponentielle, la concentration endocellulaire restant élevée pendant cette phase. Une quantité supplémentaire, souvent très importante, de toxine apparaît dans le milieu après la fin de la croissance exponentielle à la faveur d'un processus d'autolyse ou d'un changement de perméabilité de la membrane cellulaire lié à la mort des bactéries. Divers auteurs, antérieurement à nos propres recherches [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41] ont soutenu cette opinion sans arriver à la faire admettre de façon universelle. Citons Eisler et Kovacs [42, 43], Eisler [44], Nelson [45]. Prigge [46], en 1932, a fait une revue des travaux anciens et a pu préparer une poudre de corps microbiens secs contenant de la toxine diphtérique.

Ces divers auteurs se sont, en général, contentés de montrer que l'on pouvait extraire des quantités décelables de toxine à partir des corps microbiens de diverses bactéries toxinogènes prélevées à des phases souvent mal définies de la croissance. Ils ont été ainsi amenés à défendre l'opinion inverse de l'opinion classique et à affirmer :

1° Que toutes les exotoxines sont des constituants endocellulaires.

Cette affirmation nous paraît très vraisemblable, car il est infiniment probable que les synthèses de protéines se font à l'intérieur de la cellule.

2° Que la toxine est dans tous les cas libérée dans le milieu de culture à la faveur d'un processus d'autolyse, ce qui implique qu'avant ce processus, les corps microbiens contenaient la toxine à concentration élevée.

Cette dernière proposition ne nous paraît absolument pas légitime dans tous les cas.

En particulier, si on examine les résultats publiés par Morton et Gonzalez [47] et par Prigge [46] pour la toxine diphtérique, on constate que les quantités de toxine que l'on peut extraire

des corps microbiens sont toujours très faibles, de l'ordre de 0,01 à 0,05 p. 100 de la toxine totale.

Or, pour Eisler, la toxine diphtérique, la toxine tétanique, la toxine botulinique, la toxine du vibrion cholérique sont placées sur un même plan et considérées comme des constituants endocellulaires libérés dans le milieu par autolyse.

Reprenant cette étude dans le cas de la toxine tétanique, nous avons cherché à préciser la concentration relative de la toxine dans les corps microbiens et le milieu extérieur. Nous avons été frappés par le fait que cette répartition se modifiait lorsque la croissance exponentielle était terminée [41].

Ces premières recherches ont été effectuées en cultures non agitées suivant la technique employée empiriquement pour la production des toxines. Il est évident que, dans ces conditions, la croissance est difficile à contrôler. Nous nous sommes donc proposé de reprendre cette étude dans des conditions où la croissance peut être mesurée de façon plus rigoureuse. Nous avons cherché à adapter les conditions définies par Monod [48] aux milieux propres à la toxinogenèse de divers microbes aérobies et anaérobies.

TECHNIQUES.

Nous donnons plus loin les détails techniques propres à chaque toxine. Nous indiquerons simplement ici que la croissance a été mesurée par détermination de la densité optique des suspensions microbiennes au photomètre Klett-Summerson, avec l'écran 540, en tubes cylindriques standards ou en tubes en T de Monod [49] de 18 mm de diamètre.

Les valeurs lues en unités arbitraires du photomètre (Δ) ne sont proportionnelles à la densité microbienne (évaluée en azote bactérien par millilitre) que pour les faibles valeurs de la densité optique. Au delà d'un certain seuil (que nous avons trouvé de 100 unités Klett pour le *bacille diphtérique*, 50 unités pour *Welchia perfringens*, 150 unités pour le *bacille tétanique*), la densité lue (Δ) est inférieure à la densité « vraie » (δ) que l'on peut déterminer en diluant la suspension et en effectuant la lecture photométrique dans la zone de proportionnalité.

Chaque fois que nous disposons de volumes suffisants de culture, nous avons effectué la mesure, après dilution appropriée, dans la zone de proportionnalité.

Lorsque nous avons à suivre la croissance dans des tubes de faible volume, la densité corrigée (δ) a été calculée à partir de la densité lue (Δ) grâce à des courbes de correction établies pour chaque germe.

La correspondance entre les unités arbitraires corrigées et le taux d'azote bactérien par millilitre dans les conditions expéri-

mentales (souches, milieux, etc.) que nous avons employées est la suivante : 1 000 « unités arbitraires Klett corrigées » correspondent aux taux d'azote ci-dessous :

<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,340 mg N/ml
<i>Welchia perfringens</i>	0,760 mg N/ml
<i>Plectridium telani</i>	0,432 mg N/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,393 mg N/ml
<i>Clostridium histolyticum</i>	0,400 mg N/ml
<i>Clostridium septicum</i>	0,380 mg N/ml
<i>Clostridium sordellii</i>	0,317 mg N/ml
<i>Clostridium oedematiens</i>	4,150 mg N/ml
<i>Clostridium botulinum A</i>	0,330 mg N/ml

Les courbes de croissance sont établies en coordonnées semi-logarithmiques en portant en ordonnées $\log_2 \delta$ (δ = densité corrigée exprimée en unités arbitraires Klett) et en abscisses le temps.

Pour les germes aérobies, les cultures agitées ont été effectuées par trois techniques :

1° *Cultures en tubes en T de Monod*. — Le milieu est réparti sous le volume de 5 ml dans un tube de 18 × 220 mm portant une tubulure de 8 × 80 mm en son centre, ou sous le volume de 50 ml dans un tube de 60 × 280 mm portant en son centre une tubulure de 30 × 100 mm. L'agitation est assurée par un appareil donnant aux tubes un mouvement de bascule autour de leur centre de gravité au rythme de 15 ou 30 oscillations par minute.

2° *Cultures en « bactogène »*. — Nous avons employé l'appareil de Monod [50] avec diverses modifications de détail pour protéger la culture contre les contaminations extérieures, protection nécessaire dans le cas d'expériences de longue durée [fig. 1] (1).

Le ballon en pyrex de 5 l de capacité est entraîné à une vitesse de 60 tours par minute. Le milieu stérile est injecté par l'intermédiaire d'une pompe à transfusion (marque Jouvelet) dont le corps aspirant et foulant est représenté par un tube de caoutchouc de faible diamètre (0,1 mm) qui permet d'obtenir un débit minimum très réduit (0,7 ml par minute). Cet appareil peut être utilisé sans alimentation continue. Il permet d'étudier alors la courbe de croissance sur une culture de volume important (500 à 1 000 ml). Les prélèvements aseptiques répétés se font facilement grâce à une dérivation spéciale. L'agitation vive permet une aération très forte et un échange excellent entre la phase liquide et la phase gazeuse. La culture réalisée dans ces conditions expérimentales sera appelée, dans le texte, « culture en ballon tournant ».

(1) Nous adressons nos remerciements au Dr Monod pour les divers renseignements techniques qu'il nous a communiqués pour l'emploi du bactogène.

Pour les germes anaérobies, la culture a été réalisée de façon variable :

1° *Culture en tubes scellés agités.* — Le milieu est réparti à raison de 7 ml par tube de 14 × 180 mm. Après ensemencement,

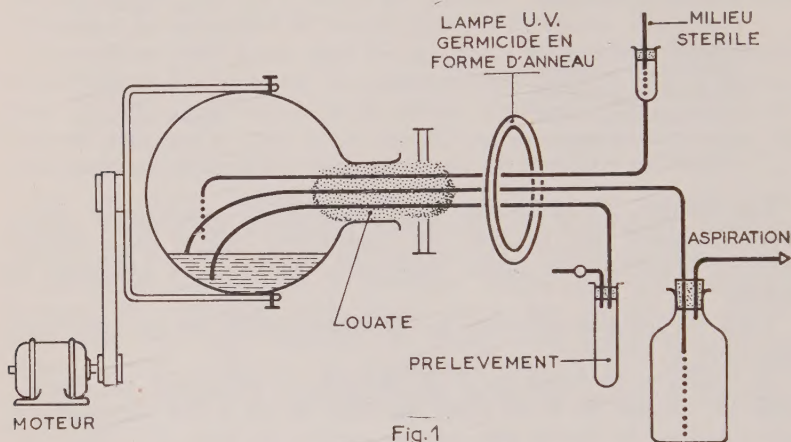


Fig. 1

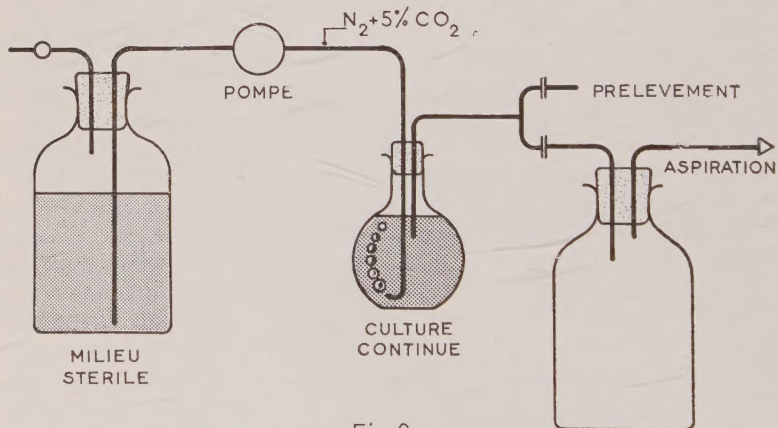


Fig. 2

les tubes sont étirés, évacués et scellés selon la technique habituelle des anaérobies [51].

Les tubes sont ensuite placés dans la machine à agiter.

2° *Culture agitée par insufflation d'azote à 5 p. 100 de CO_2 .* — La culture est effectuée en tube de 22 × 240 mm ou 40 × 240 mm. On assure l'agitation par un vif courant d'azote à 5 p. 100 de CO_2 . Cette technique donne de très bons résultats avec *W. perfringens*.

3° *Culture continue.* — L'appareil utilisé est représenté schématiquement sur la figure 2.

La vitesse d'alimentation est réglée grâce à la pompe à transfusion de façon qu'un volume de milieu égal au volume du

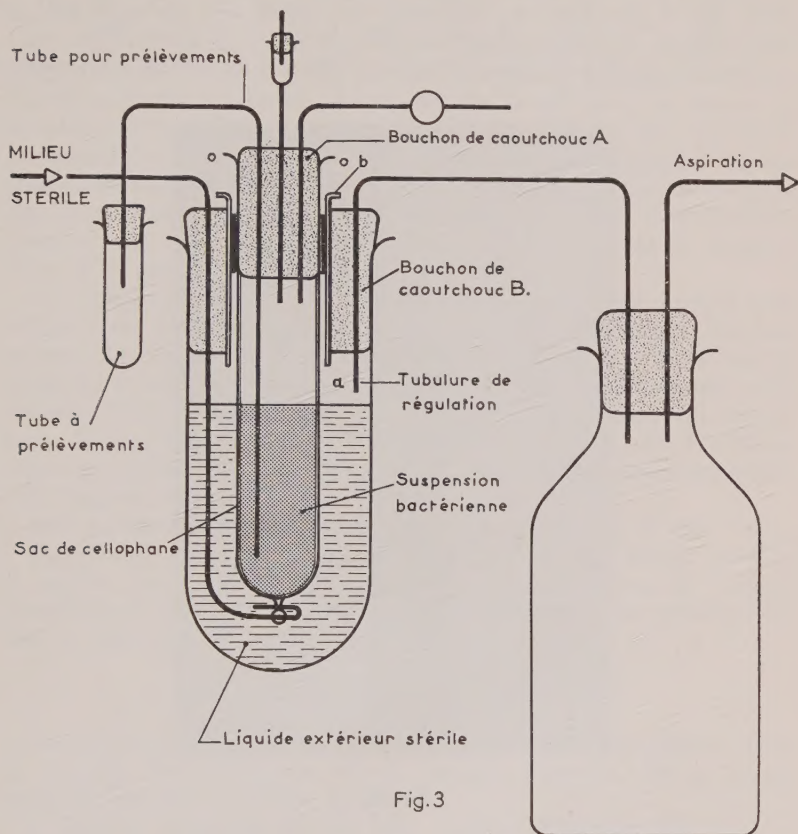


Fig.3

APPAREIL POUR LA CULTURE RAPIDE
EN SAC DE CELLOPHANE.

ballon (100 ml) soit remplacé dans un temps égal à un temps de génération.

L'agitation est assurée, de façon très efficace, par l'injection en même temps que le milieu neuf, d'un mélange d'azote + 5 p. 100 de CO_2 . On ajoute dans le ballon, avant stérilisation, une faible quantité d'anti-mousse (anti-mousse DC, à base de silicone, de la Dow Corning, marque Saint-Gobain).

4° *Culture rapide en sac de cellophane.* — Les cultures en sac

de cellophane ont été utilisées pour la production des toxines anaérobies, par Sterne et all. [52, 53, 54, 55, 56], et par Gladstone [57], Rogers [58] et Harmsen [58 bis] pour d'autres buts.

Dans les conditions précisées par Sterne, on obtient des taux très élevés de toxines botuliniques (Sterne et coll., Boroff et coll. 59) et tétanique (Fredette [60], Koch et Kaplan [61]).

Mais il est difficile de suivre la croissance au cours des longues

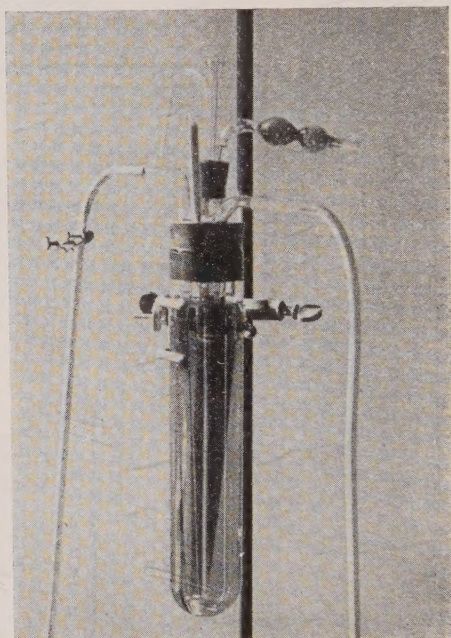


FIG. 4.

périodes d'observation (huit à vingt et un jours) nécessaires à l'obtention des taux élevés de toxine. Nos essais personnels pour établir la courbe de croissance n'ont pas donné de résultats précis, la culture étant difficile à homogénéiser avec le dispositif du « sac invaginé » de Sterne.

Nous avons alors imaginé un dispositif simple de culture en sacs de cellophane avec renouvellement du milieu nutritif à l'extérieur du sac.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Dispositif de culture. — Le dispositif que nous avons employé est représenté sur les figures 3 et 4.

Le milieu nutritif stérile circule à l'extérieur du sac à une vitesse de l'ordre de 100 ml par heure. Le niveau est maintenu constant dans le récipient extérieur par aspiration.

Lorsque le niveau du liquide baisse au-dessous du niveau de la tubulure de régulation (a), de l'air est aspiré par cette dernière ; il en résulte une dépression légère dans le récipient qui provoque une expansion du sac de cellophane. Lorsque le niveau liquide affleure au-dessus du niveau de la tubulure de niveau a, le phénomène inverse se produit, si bien que le sac contenant la suspension bactérienne subit des mouvements alternés d'expansion et de repli (un peu comme le ballonnet qui permet le contrôle des mouvements respiratoires dans les appareils d'anesthésie), mouvements qui assurent un brassage permanent de la suspension et la maintiennent en état homogène.

La semence est préparée de la façon suivante : les germes sont cultivés en ballons Erlenmeyer de 1 l à 37°, pendant dix-huit heures. La culture est centrifugée stérilement et les corps microbiens sont remis en suspension dans de l'eau physiologique additionnée d'une substance réductrice (acide ascorbique ou réductose, 10 mg/ml). La semence est introduite dans le sac. L'alimentation en milieu stérile additionné de corps réducteurs (réductose, 0,25 mg/ml) est alors mise en route.

Les souillures accidentelles sont faciles à éviter et très rares.

Par contre, si la cellophane n'est pas de très bonne qualité, il arrive que, probablement par de petites failles, le liquide circulant se trouble. Avec de bonnes cellophanes, cet accident est tout à fait exceptionnel.

TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Techniques et méthodes. — La toxinogenèse a été étudiée avec la souche Park-Williams n° 8, variété Toronto. Nous avons employé les trois milieux suivants :

1° Milieu complexe Martin [62], Loiseau-Philippe [63].

2° Milieu hydrolysate de caséine-acide glutamique.

Il s'agit d'un milieu dérivé du milieu Mueller et Miller [64, 65] et dont la préparation a été décrite ailleurs [14].

3° Milieu Drew et Mueller [66].

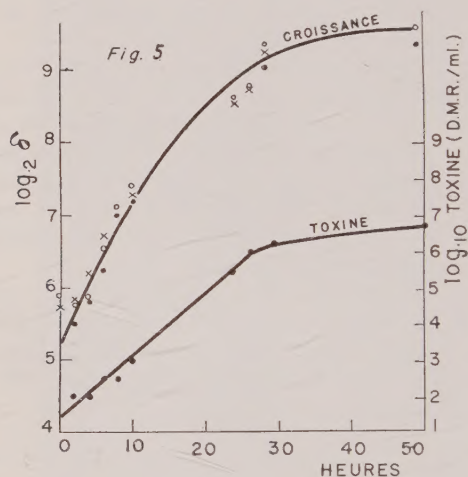
Les taux de fer résiduels dans ces milieux, après élimination par adsorption sur phosphate de calcium étaient les suivants :

Milieu 1	100 µg de fer par litre.
Milieu 2	40 µg de fer par litre.
Milieu 3	80 µg de fer par litre.

Les expériences ont été effectuées sans addition supplémentaire de fer pour le milieu 1, après addition de 100 µg de fer par litre au milieu 2, et de 175 µg de fer par litre au milieu 3, ces taux

ayant été trouvés optima dans une série d'expériences préliminaires en cultures non agitées.

La toxine diphtérique a été titrée par floculation suivant la méthode de Ramon [67] et par détermination de la Dose Minima Réactive suivant la technique de Jerne [68]. La D. M. R. est définie avec Jensen [69] comme la plus faible dilution de toxine qui, injectée par voie intradermique au lapin blanc sous le volume de 0,1 ml, provoque l'apparition d'une zone érythémateuse de 8 mm de diamètre, la mesure étant effectuée au bout de quarante-quatre heures. Ces déterminations sont faites chaque fois sur deux lapins. Les dilutions sont effectuées à 0° en employant le



mélange suivant : NaCl, 9 g ; peptone, 10 g ; H₂O, 1 000 ml. Rappelons la correspondance qui s'établit pour une toxine diphtérique apparemment dépourvue de toxoïde spontané : une solution qui contient 1 UF par millilitre contient 200 000 D. M. R. par millilitre.

La culture a été effectuée soit en tubes en T de Monod, soit en « ballon tournant », soit en bactogène avec alimentation continue.

Les résultats obtenus sur les divers milieux sont résumés dans les figures ci-jointes. La figure 5 montre l'évolution de la croissance et de la toxine en culture agitée en tubes en T, sur milieu Drew-Mueller. Le temps de génération varie suivant les expériences et reste compris entre sept et neuf heures. La formation de toxine s'arrête lorsque la croissance s'arrête. Le rapport entre l'augmentation du taux de toxine (exprimée en UF/ml) et celle de la masse microbienne exprimée en milligrammes d'azote bac-

térien ($\Delta T/\Delta N$) est sensiblement constant au cours d'une même expérience.

Sur milieu hydrolysât de caséine-acide glutamique, la culture

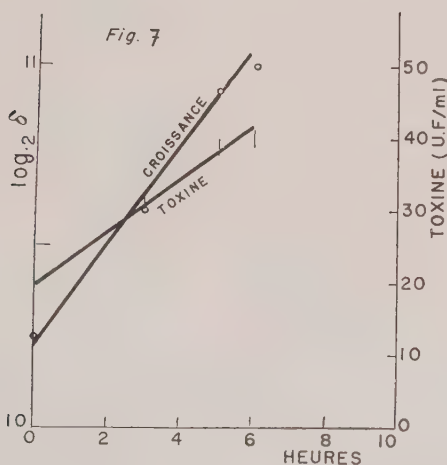
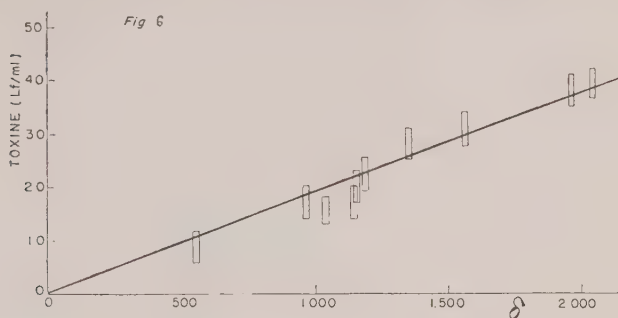


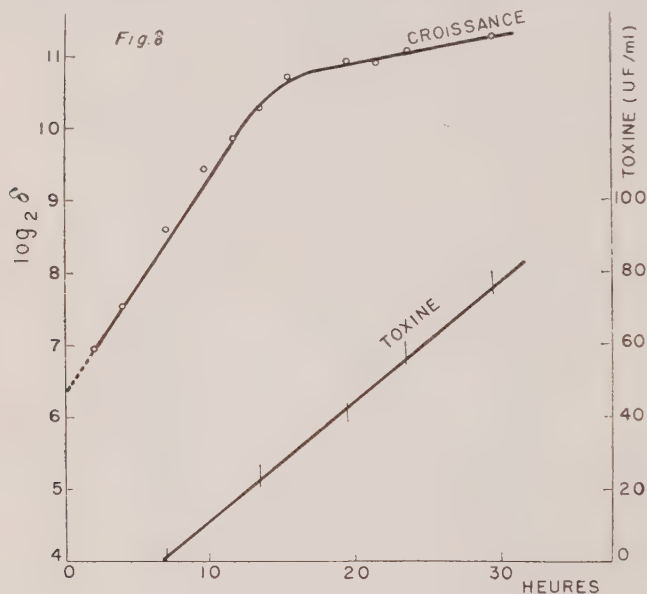
FIG. 6 et 7. — La culture a été effectuée en ballon tournant sur milieu hydrolysât de caséine jusqu'à obtenir une densité égale à 2 000. Au cours de cette période, divers prélèvements ont été effectués. La culture a ensuite été stabilisée pendant une heure à 2 000. Divers couples de valeurs (densité microbienne en unités arbitraires), toxine (exprimée en UF/ml) ont été ainsi obtenus, dont la figure 6 représente la corrélation.

Sur la figure 7, on a porté en fonction du temps, les valeurs ($\log_2 \delta$ et taux de toxine) obtenues entre la quinzième heure ($t=0$) et la vingt-et-unième heure ($t=6$) de cette expérience.

en ballon tournant donne des résultats analogues ; le temps de génération est le même, sept heures, qu'en milieu Drew-Mueller, le rapport $\Delta T/\Delta N$ est constant, comme le montrent les figures 6 et 7.

En milieu Loiseau-Philippe (fig. 8), en tubes en T de 500 ml de capacité contenant 50 ml de milieu, le temps de génération est, pour la même souche, beaucoup plus court : trois heures. Le rapport $\Delta T/\Delta N$ est constant et du même ordre de grandeur que sur le milieu hydrolysât de caséine. Le taux final de toxine est plus élevé sur ces deux milieux que sur le milieu synthétique avec la souche que nous avons employée, mais le rendement réel exprimé par le rapport $\Delta T/\Delta N$ est du même ordre de grandeur.

Sur milieu Drew-Mueller, on note, suivant les expériences, des



variations dans la valeur de ce rapport. La valeur la plus élevée que nous avons trouvée sur ce milieu est de 200 UF/mg N bactérien, les valeurs moyennes étant de 60. Ce fait semble indiquer que, pour la souche que nous employons, aucun des milieux utilisés n'est parfaitement adéquat car les temps de génération que nous avons trouvés sont sensiblement plus élevés que ceux publiés par d'autres auteurs pour *C. diphtheriae*.

Les rapports observés entre la synthèse de la toxine et la croissance sont analogues à ceux observés chez *E. coli* pour la synthèse de la β -galactosidase (Monod, Pappenheimer, Cohen-Bazire [70] et chez *St. aureus* (Rogers [71]) pour la coagulase. Ils sont différents de ceux que nous avons trouvés dans le cas de la toxine staphylococcique α [32], de la toxine α de *W. perfringens* [33] et de la

relation observée par Rogers [71] dans le cas de la hyaluronidase de *St. aureus*.

Ces résultats expérimentaux appellent quelques commentaires :

1° Il est possible d'obtenir des taux élevés de toxine (20 à

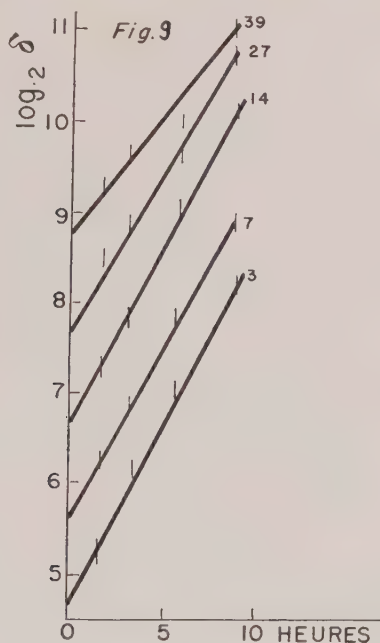


FIG. 9. — La culture est effectuée sur milieu Loiseau-Philippe, en tubes en T de 18 mm de diamètre contenant 5 ml de milieu. La semence, ajoutée au temps zéro, a été prélevée dans une culture en phase exponentielle sur le même milieu (culture de dix-huit heures agitée). Elle est ajoutée de façon à réaliser des densités initiales δ_0 de valeurs progressivement croissantes ($\delta_0 = 25, 50, 100, 200, 400$). On suit la croissance dans chaque série de tubes. Les courbes montrent que la croissance débute sans latence et se fait dans tous ces tubes de façon exponentielle. Après un intervalle de temps de neuf heures, correspondant à trois divisions, on prélève les cultures. La densité est devenue $\delta = \delta_0 \times 2^3 = 8 \delta_0$. Les taux de toxines en UF/ml obtenus dans chaque tube sont indiqués par les chiffres inscrits à la fin de chaque courbe. On constate que le taux de toxine obtenu dans chaque cas est proportionnel à la croissance totale et donc, étant donné les conditions expérimentales particulières, à la densité initiale de la semence δ_0 . On voit que pour obtenir une production de toxine à taux élevé en neuf heures (39 UF/ml), il suffit d'utiliser une semence assez dense ($\delta_0 = 400$).

40 UF/ml) après quelques heures de culture. Il suffit d'utiliser une semence suffisamment dense (fig. 9).

2° Le dispositif du ballon tournant permet d'étudier divers phénomènes associés à la production de toxine.

TABLEAU I.

MILIEU	TEMPS DE GÉNÉRATION (heures)	$\Delta T/\Delta N$ UF/mg N bactérien
Drew-Mueller	7 à 9	200 à 60
Hydrolysât de caséine-acide glutamique.	7 à 9	53
Loiseau-Philippe	3	66

3° La toxine diphtérique peut être préparée en culture continue, dans des appareils type bactogène (Monod) ou chemostat (Novick [72]) à condition de stabiliser la culture à une densité microbienne suffisamment élevée. Nous y sommes parvenus dans le milieu hydrolysât de caséine avec un volume total de milieu de 350 ml dans un ballon de 5 l et une vitesse de renouvellement du milieu de 0,75 ml/minute ; on obtient une production continue de toxine à la concentration de 20 UF/ml.

L'emploi de la culture continue permet de résoudre divers problèmes posés par l'étude de la toxinogénèse. Les résultats obtenus feront l'objet d'une publication séparée.

DISCUSSION.

Les résultats précédents montrent bien que la toxine diphtérique, quoique synthétisée très vraisemblablement à l'intérieur des corps microbiens, diffuse très facilement dans le milieu de culture. La concentration de la toxine dans ce milieu, nulle ou très faible au début de la croissance, augmente de façon sensiblement proportionnelle à la masse microbienne formée.

Nous n'avons jamais réussi, au cours de divers essais par des moyens chimiques ou mécaniques, à extraire des quantités élevées de toxine à partir des corps microbiens lavés. La présence de petites quantités de toxine dans ces derniers est par ailleurs bien établie, tant par les recherches anciennes de Prigge [46] que par celles plus récentes et plus exactes de Morton et Gonzalez [47]. Ces derniers ont montré que la teneur des corps microbiens en toxine est très faible (0,05 p. 100 de la toxine totale), même au cours de la phase active de croissance (expériences en cultures non agitées). La quasi totalité de la toxine synthétisée par la culture diphtérique est donc excrétée dans le milieu « extérieur » au fur et à mesure de son élaboration.

Le fait que la quantité de toxine présente dans le milieu n'augmente pas après la fin de la période exponentielle, comme le montrent nos résultats, confirme indirectement ce fait. Ce qui distingue donc le cas de la toxine diphtérique de celui des

toxines tétanique, botuliniques, etc., ce n'est pas une différence fondamentale de nature (exo- ou endocellulaire), mais une différence *quantitative* dans les rapports entre la concentration endocellulaire et exocellulaire de la toxine au cours de la phase exponentielle de croissance.

La toxine diphtérique est sécrétée dans le milieu dès sa formation. La concentration endocellulaire, quoique non nulle, est toujours faible. Il en résulte qu'une fois la croissance « active » terminée, la totalité de la toxine encore contenue dans les corps microbiens est faible, si bien que l'autolyse des germes ne peut libérer, malgré leur masse élevée qu'une petite quantité de toxine qui n'est pratiquement pas décelable. L'autolyse microbienne ne joue donc qu'un rôle négligeable dans la toxinogenèse.

D'autres auteurs ont étudié les rapports entre croissance et toxinogenèse. Urushibara [73] a étudié le phénomène en culture non agitée, si bien qu'il n'a pu mettre en évidence de rapport simple entre le taux de toxine et la croissance.

Watanabe [74] étudie en culture non agitée l'influence du NaCl et du fer. En présence de l'optimum de fer (100 μg de SO_4Fe , 7 H_2O par litre pour 5 g de NaCl par litre), la croissance est *régulière*. Nous avons établi avec les chiffres de Watanabe la courbe de croissance. La phase exponentielle dure trois jours environ. Le temps de génération est très long, de l'ordre de vingt-huit heures. La croissance continue à vitesse très ralentie entre le troisième et le septième jour. La toxine augmente pendant *toute la période de croissance*. Les valeurs de la toxinogenèse pendant les deux premiers jours ne sont pas fournies, car le taux de toxine était vraisemblablement inférieur au seuil décelable par floculation.

Dans toutes ces expériences en culture non agitée, la longueur de la phase de croissance ralentie rend difficile l'interprétation des rapports entre la croissance et la toxinogenèse.

Mitsuashi et al. [75, 76] ont obtenu en culture agitée des résultats qui concordent avec les nôtres à condition de reconsidérer leurs courbes de croissance. Ils ont en effet décrit une croissance linéaire pour le bacille diphtérique, alors que leurs résultats recalculés montrent au contraire une phase exponentielle classique suivie d'une phase de baisse du taux de croissance.

En conclusion, si la toxine diphtérique paraît bien synthétisée à l'intérieur des corps microbiens, elle est sécrétée aussitôt dans le milieu extérieur (milieu de culture). La concentration endocellulaire est toujours faible, correspondant à une quantité de toxine de l'ordre de 0,05 p. 100 de la toxine totale. Les processus d'autolyse après la fin de la croissance active ne jouent qu'un rôle négligeable dans la toxinogenèse. On peut obtenir des taux

élevés de toxine en culture continue ou en culture agitée de durée très brève (neuf ou quatorze heures), à condition d'employer des semences très denses.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. T. J. MORGAN. *J. Soc. chem. Ind.*, 1937, **56**, 446.
- [1 bis] W. T. J. MORGAN. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 2003.
- [2] A. BOIVIN, L. MESROBEANU et I. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 307.
- [3] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *Rev. Immunol.*, 1935, **1**, 553.
- [4] A. G. JOHNSON, S. GAINES et M. LANDY. *Fed. Proceed.*, 1954, **13**, 499.
- [5] H. RAISTRICK et W. W. C. TOPLEY. *Brit. J. exp. Path.*, 1934, **15**, 113.
- [6] M. RAYNAUD et M. DIGEON. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 564.
- [7] M. DIGEON, M. RAYNAUD et A. TURPIN. *Ces Annales*, 1952, **82**, 206.
- [8] A. M. PAPPENHEIMER JR. *J. biol. Chem.*, 1937, **120**, 543.
- [9] H. P. LUNDGREN, A. M. PAPPENHEIMER et J. W. WILLIAMS. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 533.
- [10] A. M. PAPPENHEIMER, H. P. LUNDGREN, J. W. WILLIAMS. *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 247.
- [11] M. L. PETERMAN et A. M. PAPPENHEIMER. *J. Phys. Chem.*, 1941, **45**, 1.
- [12] A. M. PAPPENHEIMER. *J. Bact.*, 1942, **43**, 273.
- [13] A. M. PAPPENHEIMER. *Adv. in Protein Chemistry*, 1948, **4**, 123.
- [14] E. H. RELYVELD, A. TURPIN, A. LAFFAILLE, C. PARIS et M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1954, **87**, 301.
- [15] C. LAMANNA, O. E. MC ELROY et H. W. EKLUND. *Science*, 1946, **103**, 613.
- [16] C. LAMANNA et H. N. GLASMAN. *J. Bact.*, 1947, **44**, 575.
- [17] H. J. BUEHLER, E. J. SCHANTZ et C. LAMANNA. *J. biol. Chem.*, 1947, **169**, 295.
- [18] F. W. PUTMANN, C. LAMANNA et D. G. SHARP. *J. biol. Chem.*, 1948, **176**, 401.
- [19] A. ABRAMS, G. KEGELES et G. A. HOTTELE. *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 63.
- [20] L. PILLEMER, R. G. WITTLER et D. B. GROSSBERG. *Science*, 1946, **103**, 615.
- [21] L. PILLEMER, R. G. WITTLER, J. I. BURRELL, D. B. GROSSBERG. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 205.
- [22] W. E. VAN HEYNINGEN et G. P. GLADSTONE. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 202.
- [23] W. E. VAN HEYNINGEN et G. P. GLADSTONE. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 221.
- [24] W. E. VAN HEYNINGEN et E. BIDWELL. *Biochem. J.*, 1948, **42**, 130.
- [25] F. B. ROTH et L. PILLEMER. *J. Immunol.*, 1953, **70**, 533.
- [26] R. G. WITTLER et L. PILLEMER. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 23.
- [27] A. TURPIN, E. H. RELYVELD, J. PILLET et M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1954, **87**, 185.
- [28] H. E. BOWEN. *Yale J. biol. Med.*, 1952, **25**, 124.

- [29] S. J. AJL, J. REEDAL, L. DURRUM et J. WARREN. *Fed. Proceed.*, 1954, **13**, 485.
- [30] J. WARREN, U. L. WALZ, J. REEDAL et S. AJL. *Fed. Proceed.*, 1954, **13**, 517.
- [31] M. RAYNAUD et R. MANGALO. VI^e Congrès Intern. Microb., Rome, 1953, C. R., vol. I, p. 376, communication n° 255.
- [32] R. MANGALO, J. PILLET et M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1031.
- [33] B. BIZZINI et M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 122.
- [34] M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.
- [35] M. RAYNAUD, B. NISMAN et R. O. PRUDHOMME. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 370.
- [36] M. RAYNAUD. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 98.
- [37] M. RAYNAUD et L. SECOND. *Ces Annales*, 1949, **77**, 316.
- [38] R. SAISSAC et M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1951, **80**, 431.
- [39] R. SAISSAC et M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1951, **80**, 434.
- [40] MIR CHAMSY et M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1951, **81**, 90.
- [41] M. RAYNAUD, R. SAISSAC, A. TURPIN et M. ROUYER. *Ces Annales*, 1952, **83**, 693.
- [42] M. EISLER et N. KOVACS. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1926, **46**, 238.
- [43] M. EISLER et N. KOVACS. *Klin. Wochenschr.*, 1927, 6^e année, 2145.
- [44] M. EISLER. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1928, **56**, 209.
- [45] C. I. NELSON. *J. inf. Dis.*, 1927, **41**, 9.
- [46] R. PRIGGE. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 1932, **77**, 421.
- [47] H. E. MORTON et L. M. GONZALEZ. *J. Immunol.*, 1942, **45**, 63.
- [48] J. MONOD. *La Croissance bactérienne*, 1 vol. Hermann, Paris, 1941.
- [49] J. MONOD, G. COHEN-BAZIRE et M. COHN. *Bioch. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 585.
- [50] J. MONOD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 390.
- [51] M. WEINBERG, R. NATIVELLE et A. R. PRÉVOT. *Les Microbes anaérobies*, 1 vol. Paris, 1936.
- [52] A. POLSON et M. STERNE. *Nature*, 1946, **158**, 238.
- [53] L. M. WENTZEL et M. STERNE. *Science*, 1949, **110**, 259.
- [54] M. STERNE et L. M. WENTZEL. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 175.
- [55] L. M. WENTZEL, M. STERNE et A. POLSON. *Nature*, 1950, **166**, 739.
- [56] M. STERNE. VI^e Congrès Intern. Microb., Rome, 1953, C. R., vol. II, p. 285, communication n° 593.
- [57] G. P. GLADSTONE. *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 379.
- [58] H. J. ROGERS. *Biochem. J.*, 1948, **42**, 433.
- [58 bis] G. W. HARMSSEN et W. J. KOLFF. *Science*, 1947, **105**, 582.
- [59] D. A. BOROFF et H. DALE CABEEN. *Feder. Proceed.*, 1954, **13**, 487.
- [60] V. FREDETTE et G. VINET. *Canad. J. Med. Sci.*, 1952, **30** (2), 155.
- [61] W. KOCH et D. KAPLAN. *J. Immunol.*, 1953, **70**, 1.
- [62] L. MARTIN. *Ces Annales*, 1898, **12**, 26.
- [63] G. LOISEAU et M. PHILIPPE. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1214.
- [64] MUELLER et P. A. MILLER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 21.
- [65] J. H. MUELLER. *J. Immunol.*, 1939, **37**, 103.
- [66] R. H. DREW et J. H. MUELLER. *J. Bact.*, 1951, **52**, 549.
- [67] G. RAMON. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661, 711, 813.
- [68] N. K. JERNE. *A Study of Avidity*, 1 vol., Copenhagen, 1951, p. 30.

- [69] Cl. JENSEN. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1933, suppl. XIV.
- [70] J. MONOD, A. M. PAPPENHEIMER Jr., G. COHEN-BAZIRE. *Bioch. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 648.
- [71] H. J. ROGERS. *J. gen. Microbiol.*, 1954, **10**, 209.
- [72] A. NOVICK et L. SZILARD. *Science*, 1950, **112**, 715 ; *Cold. Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1951, **16**, 337.
- [73] K. URUSHIBARA. *Kitasato Arch. exp. Med.*, 1951, **24**, 325.
- [74] Y. WATANABE. *Kitasato Arch. exp. Med.*, 1952, **25**, 83.
- [75] S. MITSUASHI, M. KUOKAWA et Y. KOJIMA. *Japan J. exp. Med.*, 1949, **20**, 261.
- [76] S. MITSUASHI et M. KUOKAWA. *Japan. J. exp. Med.*, 1951, **21**, 25.

STREPTOCOQUES D'ORIGINE HUMAINE

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DE 217 SOUCHES

II. — PROPRIÉTÉS SÉROLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

par G. ANDRIEU, L. ENJALBERT et L. LAPCHINE (*).

*(Chaire de Bactériologie et Hygiène.
Faculté de Médecine, Toulouse.)*

Dans un premier mémoire nous avons étudié 217 souches de streptocoques d'origine humaine d'après leurs caractères morphologiques et l'action sur eux des antibiotiques courants [1].

Dans la deuxième partie de ce travail les mêmes souches de streptocoques sont étudiées d'après leurs caractères sérologiques et biochimiques.

Nous ne dirons que peu de mots de nos tentatives d'inoculation à l'animal. Elles furent infructueuses et seul leur petit nombre nous empêchera de leur accorder plus d'attention.

Des rats adultes ont été inoculés avec de fortes doses de streptocoques β hémolytiques, récemment isolés de l'organisme au cours d'infections monomicrobiennes :

- Deux souches étaient du groupe A ;
- Deux souches étaient du groupe D ;
- Une souche du groupe B ;
- Trois souches n'étaient pas groupables.

Aucun trouble n'a été constaté, bien que chaque rat ait reçu le culot d'une culture abondante du germe (culture en 20 cm³ de bouillon glucosé) à la fois par voie sous-cutanée et intrapéritonéale.

I. — ÉTUDE SÉROLOGIQUE.

La classification de R. Lancefield est la base de toute étude sérologique des streptocoques. Nous nous sommes limités à ce groupage et n'avons pas recherché dans chaque groupe le type de chaque germe.

Au début de notre expérimentation nos extraits pour groupage étaient préparés par la technique de Lancefield à l'acide chlorhydrique N/20 et, parallèlement, par la technique de Fuller.

(*) Manuscrit reçu le 24 août 1954.

Toutes deux nous ont donné les mêmes résultats. Par la suite, tous les extraits ont été préparés par la méthode de Fuller à la formamide, plus rapide, nécessitant une quantité de culture moindre et un temps d'incubation plus court.

Nous avons utilisé pour nos groupages les sérums anti-streptococciques anglais de la marque « Burroughs Wellcome and Co » et des sérums de l'Institut Pasteur de Paris. Tous deux nous ont donné des résultats identiques.

La plupart des groupages ont été faits au lendemain de l'isolement du germe, puis refaits sur les souches conservées par repiquage et celles conservées lyophilisées. Nous n'avons jamais noté la moindre modification dans les résultats du « grouping » de Lancefield.

Nous avons aussi testé toutes nos souches non groupables, isolées d'hémocultures, en face des sérums I et II de Selbie [2]. Nous n'avons pu enregistrer que trois résultats positifs en face du sérum I. Notre travail ne traitant pas particulièrement des endocardites, nous n'aurons plus à revenir sur ce point dans la suite de notre exposé.

Nous donnons, dans le tableau I le détail des résultats de ce travail de groupage en fonction de l'origine de nos souches :

TABLEAU I. — Origine de 217 souches de streptocoques humains.

ORIGINE	TOTAL	NON GROUPÉS	GROUPES	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L
Sang.	61	31	30				11	3	3	2	9		
Gorge	89	60	29	11		3	8	1	2	2	2		
Bronche	25	18	7				5					2	
L.C.R.	5	4	1				1						
Pus	18	8	10	7			3						
Urines	11	2	11		1		9						1
Selles	1		1				1						
Crachats	5	5											
Total	217	128	89	18	1	3	38	4	7	4	13		1

Seuls sont portés dans les colonnes les groupes de Lancefield pour lesquels nous avons eu des réactions positives. Les recherches de groupage ont été faites avec les sérums A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, et N.

LES HÉMOCULTURES. — L'apparente dominance des groupes D et K est fausse, car il s'agit de prélèvements en série (les 9 souches K ont été données par deux malades et 10 souches D proviennent aussi de deux malades seulement).

Ce facteur n'a pas joué pour les souches des groupes E et F, G, H. Nous n'avons jamais eu d'hémocultures à streptocoques hémolytiques (β) ; ces germes semblent avoir disparu de l'étiologie des endocardites, septicémies aiguës. Peut-être n'y a-t-il là qu'une apparence due à la précocité des traitements antibiotiques.

Les prélèvements de gorge sont nombreux. Nous ne recevons

pratiquement que des prélèvements faits sur des gorges pathologiques (angines, scarlatines), ou des recherches de portage microbien au cours de néphrites, septicémies, méningites, etc.

Nos souches n'ont été retenues pour l'étude des streptocoques que lorsque la culture du prélèvement nous donnait une grande abondance ou une culture pure de streptocoques.

Lorsque le diagnostic de scarlatine a été porté nous avons trouvé :

Deux fois sur 3 des streptocoques du groupe A ;

Une fois sur 3 des streptocoques non groupables.

Nous pouvons séparer divers aspects des streptocoques trouvés dans les prélèvements pharyngés :

Tous les streptocoques β proviennent d'angines parmi lesquelles 6 scarlatines (groupe A) et 16 angines simples (5 groupes A, 1 groupe D et 10 non groupables) ;

Les streptocoques α sont rarement en culture pure et nous rencontrons souvent diverses variétés de streptocoques α pour un seul malade au cours d'une angine ;

Les streptocoques γ en culture pure dans un prélèvement de gorge sont beaucoup plus rares, mais coïncident souvent avec une angine clinique.

Deux exemples suffisent à montrer que toute conclusion *a priori* est difficile :

Obs. 31583 : angine aiguë, donne un streptocoque α du groupe G et un streptocoque β du groupe A.

Obs. 399 : angine aiguë, donne un streptocoque α du groupe H et un streptocoque β du groupe H.

LES PRÉLÈVEMENTS ENDOBRONCHIQUES. — Les sécrétions à ense-mencer sont abondantes, obtenues par aspiration dans la sonde endobronchique. Nos cultures restent souvent stériles.

Lorsque les streptocoques sont abondants il s'agit toujours de germes α ou γ . Très peu sont groupables et la notion de groupe n'apporte pas grand'chose à l'interprétation du rôle étiologique de ces streptocoques.

Sur 25 prélèvements ayant donné des cultures abondantes, parfois pures, de streptocoques, nous trouvons seulement 5 groupes D et 2 groupes K.

Le seul liquide céphalo-rachidien groupé (groupe D) provient d'un malade atteint de septicémie à streptocoque du groupe D.

Les prélèvements de pus sont d'origines variées ; les 7 souches du groupe A, sur 10 streptocoques groupables, viennent d'infections aiguës.

La majorité des streptocoques venant des urines sont groupables et du groupe D. L'unique prélèvement de selles retenu pour cette étude vient d'un nourrisson, le streptocoque du

groupe D y était à l'état pur [3]. Par contre, aucun des germes provenant de *crachats* n'a pu être groupé.

Nous voyons donc, parmi ces 89 souches groupées sur 217, que la notion de groupe est particulièrement importante pour les groupes A et D. Pour les streptocoques du groupe A il s'agit toujours d'une infection aiguë (scarlatine, angine, abcès divers...). Le groupe D semble réparti dans tous les prélèvements quelle que soit leur origine et l'allure de l'infection est variable.

La notion de groupe nous a souvent apporté le caractère de précision nécessaire à l'identification de streptocoques dans des prélèvements en série chez le même malade. Nous citerons à ce propos une observation particulièrement intéressante.

M^{lle} Odette B..., 26 ans, hospitalisée dans le Service de Clinique Médicale de M. le professeur Mériel pour cardiopathie fébrile.

Six hémocultures pratiquées en série donnent des streptocoques. La morphologie des germes, la forme des colonies, les caractères biochimiques concordent. Le groupage nous montre que 5 souches sur 6 sont du groupe K, bien que la souche non groupable ne diffère pas, en apparence, des autres.

L'ablation des amygdales est pratiquée chez cette malade. Dans la profondeur des cryptes de la pièce opératoire nous trouvons une culture pure de streptocoque comparable aux germes du sang : il est du groupe K.

II. -- ETUDE BIOCHIMIQUE.

Malgré le très grand intérêt de la méthode de Lancefield, et en raison du très grand nombre de souches non groupables, nous avons cherché à pousser l'étude biochimique de chacune de nos souches. Notre but est donc multiple puisque nous chercherons à « identifier » les streptocoques non groupables et comparerons pour les mêmes réactions biochimiques les germes groupés et non groupés.

Les techniques utilisées. — Toutes les réactions indiquées dans nos tableaux sont évidemment faites sur des germes en culture pure, surveillées pendant quarante-huit heures d'étuve.

Chaque réaction, refaite à plusieurs reprises sur un même germe, a toujours donné le même résultat après plusieurs repiquages ou après lyophilisation de la souche.

Les caractères indiqués pour les colonies (β , α , $\alpha + h$ ou γ) sont étudiés sur gélose au sang de lapin, en surface et en profondeur, avec lecture au faible grossissement du microscope [4].

Nos milieux sont à base de bouillon au cœur de bœuf digéré par la trypsine et enrichi d'extraits de levures.

Pour l'étude de la *résistance* à la chaleur nous procédons de la façon suivante : en une ou deux ampoules contenant environ 2 cm³ de bouillon sontensemencées de II à III gouttes de la culture de vingt-quatre heures du streptocoque à étudier. Les ampoules sont scellées,

puis immergées complètement, dans un bain-marie à 61-62° pendant trente minutes. On met ensuite les ampoules à l'étuve à 37° sans les ouvrir. La lecture se fait après vingt-quatre et quarante-huit heures. Si le germe résiste à la chaleur, la pousse est évidente et indiscutable.

Le *bouillon hypersalé* (6,5 p. 100) est conservé en petits flacons bouchés d'une capsule, et non en tube, pour éviter l'évaporation qui perturbe très vite la valeur de l'épreuve.

Le *milieu bilié* est préparé avec de la bile desséchée (bile extract Difco), réhydratée et ajoutée à la gélose fondue pour atteindre une concentration de 40 p. 100 de bile.

Le *milieu à l'éthyl-hydrocuprine* (E. H. C.) est préparé au moment de l'emploi. La solution mère, en eau distillée stérile à 1/5 000, se garde bien en glacière. A partir de cette dilution on prépare une gélose-sérum contenant 1/50 000 de H. E. C. et l'on coule en boîtes de Petri.

Pour ces trois derniers milieux la pousse est évidente ou nulle.

Pour le *lait tournesolé* nous ajoutons, à 6 à 7 cm³ de lait écrémé stérile, II gouttes de teinture de tournesol R. A. L. Les cultures sont étudiées après quarante-huit heures et trois jours d'étuve. Les variations ne se produisent plus après trois jours d'étuve.

Le *milieu à l'esculine* est la classique gélose à l'esculine des bactériologistes, fraîchement préparée.

Les milieux sucrés : dans 5 cm³ de bouillon ordinaire nous ajoutons une quantité suffisante de lactose, mannitol, raffinose, ou sorbitol pour avoir une concentration finale de 1 p. 100. Nous ajoutons ensuite II à III gouttes de rouge de phénol choisi comme indicateur coloré. Une réaction positive correspond à un virage du colorant au jaune citron. Une réaction négative laisse le colorant rouge orangé.

A. LES STREPTOCOQUES GROUPABLES. — Le tableau II résume toutes les réactions biochimiques faites sur les streptocoques groupables et nous avons cru bon de montrer dans ce même tableau quel était l'aspect des colonies en surface et en profondeur sur la gélose au sang de lapin. Toutes les réactions biochimiques sont classées d'après l'aspect des colonies en profondeur.

Nous voyons que pour les groupes A, B et C toutes les souches sont β , donc hémolytiques. Le groupe D est très hétérogène, mais fournit la plus grande partie des souches γ .

Pour les autres groupes nous ne pouvons que remarquer la très faible proportion de streptocoques β parmi nos souches, ce qui n'est pas classique [4]. Swift, dans le traité de Dubos, donne tous les streptocoques groupables (sauf D et N) comme des hémolytiques β [5].

Dans la deuxième partie de ce tableau II, nous donnons les résultats des épreuves et réactions biochimiques. Chaque fraction indique, par son numérateur, le nombre de réactions positives et, par son dénominateur, le nombre de réactions négatives pour l'ensemble des souches du même groupe sérologique.

TABLEAU II. — Etude de 89 souches de streptocoques d'origine humaine groupés par la méthode de Lancefield.

(Caractères des colonies sur gélose au sang et réactions biochimiques).

Nombre total			A	B	C	D	EF	G	H	K	L
de colonies	β	24	17	1	3	2	0	0	1	0	0
	$\alpha+h$	17	0	0	0	4	3	4	1	5	0
de surface	α	22	0	0	0	12	0	2	2	6	0
	γ	25	0	0	0	20	1	1	0	2	1
de colonies	β	25	18	1	3	2	0	0	1	0	0
	$\alpha+h$	21	0	0	0	7	3	4	1	6	0
en profondeur	α	18	0	0	0	10	0	1	2	5	0
	γ	23	0	0	0	18	1	1	0	2	1
Résistance chaleur. . . +/-			0/18	0/1	0/3	33/5	0/4	1/6	0/4	0/13	1/0
Bouillon C1Na 6,5 % . +/-			1/17	0/1	0/3	35/3	0/4	2/5	0/4	0/13	0/1
Milieu bilié 40 % . +/-			0/18	0/1	0/3	35/3	1/3	1/6	0/4	0/13	1/0
Milieu E.H.C. 1/50.000(1)			0/18	0/1	0/3	0/38	1/3	0/7	0/4	1/12	0/1
Lait tournesolé. . +/-.(2)			3/15	0/1	2/1	38/0	3/1	1/6	0/4	11/2	1/0
Esculine. +/-			0/18	0/1	0/3	35/3	0/4	2/5	0/4	0/13	1/0
Lactose +/-			16/2	1/0	2/1	37/1	3/1	5/2	4/0	10/3	1/0
Mannitol. +/-			0/18	0/1	0/3	34/4	0/4	1/6	1/3	0/13	1/0
Raffinose +/-			2/16	0/1	1/2	3/35	2/2	4/3	0/4	3/10	0/1
Sorbitol +/-			5/13	0/1	2/1	34/4	1/3	3/4	3/1	2/11	1/0

Note : pour chaque épreuve biochimique, les fractions +/- expriment : en numérateur le nombre d'épreuves ou réactions positives ; en dénominateur le nombre d'épreuves ou réactions négatives.

(1) E. H. C. = éthylhydrocuprine.

(2) Réaction positive signifie acidification, ou réduction du tournesol, ou coagulation du lait, ou l'ensemble de ces réactions.

C'est ainsi que pour l'ensemble de réactions :
résistance à la chaleur (62° pendant trente minutes) ;
pousse en milieu au C1Na à 6,5 p. 100 ;
pousse en milieu bilié à 40 p. 100 ;
fermentation l'esculine ;
fermentation du mannitol,

les streptocoques du groupe D se conduisent avec une grande régularité, donnant des épreuves positives pour toutes les réactions (à l'exception de 3 souches sur 38).

Pour les mêmes réactions, les streptocoques des autres groupes se conduisent de façon régulière mais contraire aux souches D, donnant des résultats négatifs (à 11 exceptions près sur 51 souches). Parmi ces 11 exceptions, le plus grand nombre est fourni par le groupe G.

Par son action sur le lait tournesolé le groupe K paraît se rapprocher du groupe D, mais nous devons préciser que nos souches K proviennent de 3 malades seulement, ce qui explique leur comportement identique.

Sur 89 souches groupées, 10 souches seulement ne fermentent pas le lactose et ces exceptions font partie de tous les groupes.

Les caractères du groupe D sur raffinose et sorbitol pourraient paraître intéressants en raison de leur régularité relative ; mais tous les autres groupes sont hétérogènes, ce qui enlève leur valeur de classification à ces réactions.

PROBLÈMES D'IDENTIFICATION PARTICULIERS AU GROUPE D. — Les streptocoques du groupe D se singularisent par leur comportement spécial parmi les autres streptocoques groupables, ce sont les *entérocoques*. Cette identité est apparue à R. Lancefield dès ses premiers travaux sur le groupage des streptocoques. Avant les travaux de Lancefield, les entérocoques constituaient un groupe de germes vu de façon différente par les bactériologistes, mais l'identité du germe, considéré ou non comme un streptocoque, a reposé très tôt sur un ensemble de réactions qui gardent toute leur valeur. Les entérocoques sont des streptocoques, à colonie spéciale mais toujours « catalase négative » qui :

font fermenter l'esculine,
résistent trente minutes à 61-62° C,
poussent en milieu bilié à 40 p. 100,
poussent en bouillon au ClNa à 6,5 p. 100,
font fermenter le mannitol.

Ces 5 réactions ne constituent qu'une partie des conditions et milieux hostiles qui identifient les entérocoques. Ce sont les seules étudiées pour nos germes en raison des difficultés matérielles entraînées par d'autres épreuves (pousse à 45°, à 10° par exemple).

Nous y avons ajouté l'aspect en surface et en profondeur, sur gélose au sang de lapin, de la colonie étudiée au faible grossissement du microscope.

Lancefield a montré que les entérocoques se classaient dans le groupe D, cette opinion a été confirmée par de nombreux travaux ultérieurs [6, 7, 8, 9, 10] et l'étude de nos 38 souches confirme nettement cette opinion devenue classique.

Dans le tableau III nous donnons les résultats de l'identification biochimique de 38 souches du groupe D. Trente et une souches répondent parfaitement à la définition de l'entérocoque et 7 souches ont des caractères atypiques sans régularité. Nous avons indiqué les antibiotiques utilisés chez le malade au moment de l'isolement du germe, car il semble bien n'y avoir aucune relation entre les caractères atypiques de certaines souches et l'action des antibiotiques.

TABLEAU III. — Identification de 38 souches de streptocoques du groupe D (origine humaine)

Caractères des colonies sur gélose au sang à l'isolement. épreuves biochimiques.

souches	origine	(1) colonies		(2) Chaleur	milieux (23)		E sulfine	traitement au moment de l'isolement (3)
		S	P		CLNa 6,5	Bile 40		
I	sang, endocardite	α	α	+	+	+	+	néant
468	gorge conv. scarlatine	β	β	+	+	+	+	P.
2.274	pus d'abcès	γ	γ	+	+	+	+	P.S.
3.469	sang, endocardite	α	α	+	+	+	+	néant
3.492	"	α	α	+	+	+	+	néant
3.533	"	γ	γ	+	+	+	+	néant
3.534	"	γ	γ	+	+	+	+	P.S.
3.557	"	γ	γ	+	+	+	+	P.S.
3.575	"	α	$\alpha+h$	+	+	+	+	P.S.
3.787	"	γ	γ	+	+	+	+	P.S.
3.872	"	$\alpha+h$	$\alpha+h$	+	+	+	+	P.S.
30.022	"	γ	γ	+	+	+	+	T.
30.035 I	dilatation bronchique	$\alpha+h$	$\alpha+h$	+	+	+	+	P.
30.035 2	"	$\alpha+h$	$\alpha+h$	+	+	+	+	P.
30.052	endocervix	γ	γ	+	+	+	+	néant
30.096	abcès du poulmon	α	$\alpha+h$	+	+	+	+	P.A.T.
30.109	sang	α	α	+	+	+	+	néant
30.128	urines	α	α	+	+	+	+	P.S.
30.131	gorge	α	α	+	+	+	+	P.S.
30.134	pus pleural	α	α	+	+	+	+	P.S.
30.445	gorge	α	α	+	+	+	+	néant
30.855	bronche, abcès poulmon	$\alpha+h$	$\alpha+h$	+	+	+	+	néant
31.126	gorge, méningite	$\alpha+h$	α	+	+	+	+	P.S., sulfam.
31.835	urines, endocardite	$\alpha+h$	$\alpha+h$	+	+	+	+	P.
32.009	gorge, septicémie	α	α	+	+	+	+	P.S.A.C.T.
32.976 I	urines	γ	γ	+	+	+	+	cortisone
32.976 2	urines	α	$\alpha+h$	+	+	+	+	cortisone
32.298	urines, oedèmes	γ	γ	+	+	+	+	néant
40.198	L.C.R.	"	"	+	+	+	+	F.S.
40.204	urines	"	"	+	+	+	+	?
40.215	gorge	"	"	+	+	+	+	?
40.239	urines, néphrite	"	"	+	+	+	+	néant
40.247	gorge, rhumatisme	"	"	+	+	+	+	néant
40.290	dilatation bronchique	"	"	+	+	+	+	néant
40.330	urines	"	"	+	+	+	+	néant
40.785	urines	"	"	+	+	+	+	néant
40.790	gorge, angine	"	"	+	+	+	+	néant
41.259	urines	β	β	+	+	+	+	O.

(1) S = colonie de surface ; P = colonie en profondeur.

(2) [+] = pousse du germe { après quarante-huit heures d'étuve à 37° C.
[-] = absence de pousse

(3) P = Pénicilline ; A = Auréomycine ; C = Chloramphénicol ; S = Streptomycine ; T = Terramycine.

Le tableau III montre que le caractère des colonies sur gélose au sang se répartit pour 38 souches D (colonies profondes), en :

Colonies β : 2.

Colonies $\alpha + h$: 8.

Colonies α : 10.

Colonies γ : 18.

Plus que la transformation irrégulière du milieu au sang importe, à notre avis, l'aspect de la colonie d'entérocoque sur laquelle nous avons longuement insisté (3 exceptions à l'aspect typique sur 38 souches).

TABLEAU IV. — Classification biochimique de 36 souches de streptocoques du groupe D (origine humaine).

souches	lait tourne- solé (1)	Mannitol	Raffinose	Arginine	Tellurite	Gélatine	Noms (2)
468	RA	+	-	+	-		## St. faecium
2.274	RA	+	-	+	-		## St. faecium
3.489	RAC	+	-	+	+	+	St. liquefaciens
3.492	RAC	+	-	+	+	+	St. liquefaciens
3.533	RA	+	-	+	+	+	St. liquefaciens
3.534	RA	+	-	+	+	-	St. faecalis
3.557	RA	+	-	+	-		## St. faecium
3.575	RA	+	-	+	-		## St. faecium
3.787	A	+	-	+	-		## St. faecium
3.872	RA	+	-	+	-		## St. faecium
30.022	RAC	+	-	+	+	+	St. liquefaciens
30.035 I	RA	+	-	+	-		## St. faecium
30.035 2	RAC	+	-	+	-		St. faecium
30.052	A	+	-	+	-		## St. faecium
30.096	A	-	-	+	-		St. Durans
30.109	RAC	+	-	+	+	-	St. faecalis
30.128	RAC	+	-	+	+	-	St. faecalis
30.131	RAC	+	-	+	+	-	St. faecalis
30.134	RAC	-	-	+	+	-	?
30.445	RAC	+	-	+	-		St. faecium
30.855	AO	-	+	+	-		?
31.126	RA	+	-	+	-		## St. faecium
31.835	A	+	-	+	-		## St. faecium
32.009	RA	+	+	+	-		?
32.976 I	RA	+	-	+	-		## St. faecium
32.976 2	RAC	+	-	+	-		St. faecium
33.298	RAC	+	-	+	-		St. faecium
40.198	RA	+	-	+	+	-	St. faecalis
40.204	A	+	-	+	-		## St. faecium
40.215	AC	-	+	-	-		St. bovis
40.239	RAC	+	-	+	+	+	St. liquefaciens
40.247	RA	+	-	+	-		## St. faecium
40.290	RA	+	-	+	-		## St. faecium
40.330	RAC	+	-	+	-		St. faecium
40.790	RA	+	-	+	-		## St. faecium
41.259	RA	+	-	+	+	-	St. zymogenes

(1) Pour le lait tournesolé R = Réduction { de l'indicateur coloré.
A = Acidité
C = Coagulation du lait.

(2) Le signe ## est mis pour « très voisin de ».

Dans la deuxième colonne du tableau III nous retrouvons la notion de l'étendue des infections à streptocoques du groupe D chez l'homme, puisque tous nos prélèvements proviennent de cas pathologiques. Devant le grand nombre d'infections à entérocoques nous nous sommes efforcés de distinguer entre eux les germes de ce groupe, en essayant de les classer en variétés d'après une succession de réactions ou épreuves biochimiques simples.

Dans le tableau IV nous donnons les résultats de cette tentative de classification pour 36 souches de streptocoques du groupe D.

Les diverses réactions utilisées sont connues en bactériologie courante et nous avons suivi pour les détails techniques le protocole d'identification du « Streptococcal Reference Laboratory » de Londres [Dr R. E. O. Williams] (tableau V).

TABLEAU V.

NOMS	LAIT TOURNESOLÉ	MANNITE	RAFFINOSE	ARGININE	TELLURITE	GÉLATINE
<i>St. fecalis</i>	A ou RAC	+	—	+	+	—
<i>St. fecalis liquefaciens</i>	A ou RAC	+	—	+	+	+
<i>St. fecalis zymogenes</i>	Semblable au <i>St. fecalis</i> , mais hémolytique (3)					
<i>St. faecium</i>	RAC	+	—	+	—	
<i>St. durans</i>	A	—	—	+	—	
<i>St. bovis</i>	A	±	+	—	—	

Techniques. — Chaque souche a été étudiée sur différents milieux :
Le lait tournesolé, après quarante-huit heures d'étuve à 37°, donne quatre sortes de réactions isolées ou combinées :

Acidification (A) ;

Acidification + coagulation (AC) ;

Réduction + acidification (RA) ;

Réduction + acidification + coagulation (RAC).

La lecture est facile et ne laisse pas place à discussion. Nous avons employé la teinture de tournesol R. A. L.

Les milieux sucrés (mannitol et raffinose) aident à la différenciation de *St. durans* et *St. bovis* parmi les autres entérocoques.

Le milieu à l'arginine permet d'étudier par le réactif de Nessler la production de NH_4 après huit jours d'étuve à 37°.

Composition du milieu :

Peptone	0,5	p. 100
Extrait de levure	0,5	p. 100
K_2HPO_4	0,2	p. 100
Glucose	0,05	p. 100
Monohydrochlorure d'arginine	0,3	p. 100

La lecture de la réaction est facile : dès que l'on ajoute II gouttes de réactif de Nessler le milieu vire au jaune orangé s'il y a production de NH_4 . Le bouillon garde sa teinte normale pour les streptocoques *bovis* qui ne produisent pas d'ammoniaque.

Le lendemain, si les tubes ne sont pas agités, le précipité est rouge brique pour les réactions positives et vert olive pour les réactions négatives.

Le milieu au tellurite de K est le classique milieu de Mac Leod, sur lequel poussent seuls les streptocoques *faecalis*.

L'étude sur gélatine a été faite en plaçant nos tubes à 37° pendant quarante-huit heures. Un refroidissement ultérieur de quelques heures en glacière rend très facile la lecture de la présence ou absence de liquéfaction. Celle-ci ne s'observe que pour une partie des souches ayant poussé sur tellurite, ce qui permet de ne pas la rechercher sur les souches tellurite (—).

Cet essai de classification dans le groupe des entérocoques nous donne, pour les 36 souches étudiées, 18 souches classables :

<i>Streptococcus faecalis</i>	5
<i>Streptococcus liquefaciens</i>	5
<i>Streptococcus zymogenes</i>	1
<i>Streptococcus faecium</i>	5
<i>Streptococcus durans</i>	1
<i>Streptococcus bovis</i>	1

et 18 souches non classées qui, pour la plupart, se rapprochent beaucoup de *Streptococcus faecium*.

Cette classification a d'abord un intérêt purement bactériologique, puisqu'avec un ensemble très limité de réactions nous avons pu fixer la variété de la moitié de nos souches de groupe D. Ces résultats sont très comparables à ceux des auteurs ayant utilisé d'autres classifications parfois plus complexes [9, 11].

Toutes les souches dont la variété a pu être définie donnent les réactions biochimiques typiques des entérocoques (sauf un *Streptococcus bovis*). Mais bien des entérocoques typiques aussi restent inclassés pour la variété.

L'intérêt en clinique humaine, de ces classifications, est peut-être plus discutable. Très souvent la notion de streptocoque du groupe D suffit en raison de ses conséquences thérapeutiques. Mais l'une de nos observations montre que la recherche de la variété dans le groupe peut aussi avoir un intérêt clinique : 4 hémocultures à *Streptococcus liquefaciens* en l'espace de plusieurs mois chez le même malade ont été le témoin de la permanence d'une seule infection.

B. LES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES. — Nous avons étudié, pour les streptocoques non groupables, exactement les mêmes réactions que celles dont les résultats sont donnés dans le tableau II pour les streptocoques groupables.

Nos techniques sont identiques et le tableau VI disposé, pour la commodité de la comparaison, de la même façon que le tableau II.

TABLEAU VI. — Etude de 128 souches de streptocoques d'origine humaine non groupables par la méthode de Lancefield (Caractères des colonies sur gélose au sang et réactions biochimiques).

Nombre total			sang	gorges	bronches	L.C.R.	pus	urines	cra-chats
de	β	16	0	13	2	0	1	0	0
colonies	$\alpha + h$	42	8	24	5	0	2	1	2
de	α	46	15	18	6	3	1	1	2
surface	γ	24	8	5	5	1	4	0	1
<hr/>									
de	β	20	0	15	3	0	2	0	0
colonies	$\alpha + h$	50	12	28	6	0	1	2	3
en	α	32	11	12	4	3	1	0	1
profondeur	γ	24	8	5	5	1	4	0	1
<hr/>									
Résistance chaleur. . .	+/-	2/29	2/58	2/16	0/4	3/5	1/1	0/5	
Bouillon ClNa 6,5 % . .	+/-	1/30	5/55	0/18	1/3	2/6	0/2	0/5	
Milieu bilité 40 % . . .	+/-	2/29	5/55	2/16	0/4	5/3	0/2	1/4	
Milieu E.H.C. 1/50.000(1)+/-		3/28	1/59	1/17	0/4	0/5	0/2	1/4	
Lait tournesolé.(2)+/-		10/21	19/41	12/6	1/3	4/4	2/0	2/3	
Tesculine	+/-	4/27	5/55	2/16	0/4	3/5	0/2	1/4	
Lactose	+/-	23/8	45/15	13/5	3/1	5/3	2/0	4/1	
Mannitol.	+/-	11/20	11/49	0/8	1/3	6/2	0/2	1/4	
Raffinose.	+/-	5/26	17/43	10/8	1/3	1/7	1/1	1/4	
Sorbitol.	+/-	17/14	25/35	7/11	2/2	4/4	1/1	3/2	

Note : pour chaque épreuve biochimique, les fractions +/- expriment : en numérateur le nombre d'épreuves ou réactions positives; en dénominateur le nombre d'épreuves ou réactions négatives.

(1) E. H. C. = éthyl-hydrocuprine.

(2) Réaction positive signifie acidification, ou réduction du tournesol, ou coagulation du lait, ou l'ensemble de ces réactions.

Nous avons dû faire une seule différence : les souches non groupables sont réparties d'après l'origine des prélèvements dont elles proviennent.

Une première remarque s'impose : la presque totalité de ces souches se comporte comme les streptocoques groupables ne faisant pas partie du groupe D :

Elles ne résistent pas à la chaleur ;

Elles ne poussent pas en bouillon hypersalé à 6,5 p. 100 ;

Elles ne poussent pas sur milieu bilié à 40 p. 100 ;

Elles ne font pas fermenter l'esculine.

Les exceptions sont un peu plus nombreuses pour les streptocoques non groupables que pour les groupables, en particulier pour la fermentation du mannitol (30 souches sur 128 attaquent le mannitol).

Tous les autres caractères étudiés dans le tableau VI, y compris l'aspect sur gélose au sang, ne permettent aucune conclusion relative à la classification des streptocoques non groupables.

TENTATIVE DE CLASSIFICATION DES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES.

— Nous avons appliqué à ces 128 souches, non groupables par la méthode de Lancefield, le *protocole d'identification* du « Streptococcal Reference Laboratory » de Londres que nous a communiqué le Dr R. E. O. Williams (1953). Chaque souche à identifier est soumise à une suite de réactions dépendant les unes des autres.

Culture sur milieu bilié à 40 p. 100 :

Culture + . . . *St. agalactiae*.

Culture — . . . rechercher les caractères de la colonie sur gélose au sang.

1° La colonie est α (ou $\alpha + h$) :

Ne pousse pas sur E. H. C. : *St. pneumoniae* ;

Pousse sur E. H. C. : dextran +, *St. sanguinis* ;

dextran —, pas de nomenclature possible.

2° La colonie est γ :

levan + : *St. hominis* (ou *salivarius*) ;

levan — : tous les streptocoques non hémolytiques non encore identifiés ;

3° La colonie est β : tous les streptocoques β non groupables.

Nos résultats sont les suivants, pour 128 souches de streptocoques non groupables.

Culture sur milieu bilié à 40 p. 100 :

Culture +	7 souches
Culture —	121 souches

Colonies sur gélose au sang (lues en surface) :

1° Colonies α (ou $\alpha + h$) : 81 souches.

Ne poussent pas sur E. H. C.	78 souches
Poussent sur E. H. C.	3 souches
Dextran +	1 souche
Dextran —	2 souches

2° Colonies γ : 24 souches.

Levan +	8 souches
Levan —	16 souches

3° Colonies β : 16 souches.

La culture sur milieu bilité est semblable à celle pratiquée pour les entérocoques, et lorsqu'un germe non groupable pousse sur bile il faut toujours vérifier qu'il ne s'agit pas vraiment d'un entérocoque du groupe D ou d'un *Streptococcus agalactiae* du groupe B.

Nous avons rencontré 7 souches de *Streptococcus agalactiae* non groupables poussant sur bile. Aucun de ces germes n'a une colonie typique d'entérocoque et les épreuves des milieux hostiles sont négatives.

Pour les 121 souches notées bile (—), l'absence de culture est totale sur le milieu pendant plusieurs jours.

La culture sur milieu à l'éthyl-hydrocuprine pour les souches α est facile à lire. La pousse, quand elle existe, est indiscutable. Nous sommes étonnés par le grand nombre de souches ne poussant pas sur milieu E. H. C., sans pouvoir dire la valeur de cette constatation. Mais nous constatons que les 78 souches qui, par l'absence de pousse sur E. H. C. se placeraient dans la variété *St. pneumoniae*, ont des origines très variées (tableau VII). La réaction recherchée plusieurs fois pour chaque souche est toujours restée négative.

Sur les trois souches poussant sur E. H. C. nous avons étudié la production de dextran. Celle-ci se recherche sur le milieu suivant, à pH 7,4 :

Peptone	1	p. 100
Extrait de levure	0,5	p. 100
K ₂ HPO ₄	0,5	p. 100
Saccharose	5	p. 100

La culture est laissée cinq jours à l'étuve. Certains streptocoques synthétisent dans ce milieu des polysaccharides de consistance gommeuse (dextran +). Des sérums spécifiques, préparés sur lapin, sont capables de mettre en évidence la production de ces polysaccharides par une réaction comparable au « grouping » de Lancefield.

En utilisant la même propriété de certains sérums antipneumococciques (type 2 ou type 20), on parvient à identifier quelques-uns de ces producteurs de dextran, ce sont les *St. sanguinis* parmi lesquels se placeraient les *Streptococcus S. B. E.* des auteurs américains.

Une seule souche nous a donné une production de dextran, ce germe provient d'un prélèvement de crachats chez un sujet atteint de glomérulo-néphrite.

Pour les souches dont la colonie est γ sur gélose au sang nous avons recherché la production d'un autre polysaccharide : *levan* +.

Les germes sont cultivés sur gélose enrichie de sérum de cheval stérile (5 p. 100) et de saccharose stérile (5 p. 100). Sur ce milieu, les colonies de *St. salivarius* synthétisent le *levan* et se présentent comme de véritables petits pains de sucre de plusieurs millimètres de hauteur. Les autres streptocoques *levan* (—) ont leur colonie habituelle.

Nous avons rencontré 8 souches de *St. salivarius* répondant à cette définition et, comme le montre le tableau VII, ces germes proviennent d'origines très diverses, bien qu'ils soient en général considérés comme des hôtes normaux du rhino-pharynx et de la bouche.

D'ailleurs, nos 16 souches *levan* (—) ont des origines aussi variées (sang, 4 ; gorge, 3 ; bronches, 5 ; pus, 3 ; crachats, 1).

Pour les souches de streptocoques β faisant partie des germes non groupables nous trouvons des origines moins variées, avec une prédominance de prélèvements pharyngés au cours d'angines simples (sang, 0 ; bronches, 2 ; gorge, 13 ; pus, 1).

TABLEAU VII. — Essai de classification de 128 souches de streptocoques humains sérologiquement non groupables

ORIGINES	NOMBRE DE SOUCHES	<i>St. agalactiae</i>	<i>St. pneumoniae</i>	<i>St. sanguinis</i>	<i>St. salivarius</i> ou <i>hominis</i>	INCLASSÉS
Sang.	31	2	19	0	4	6
Gorge.	60	4	38	0	2	16
Bronches.	18	0	11	0	0	7
L. C. R.	4	0	3	0	1	0
Pus	8	1	2	0	1	4
Urines	2	0	2	0	0	0
Crachats	5	0	3	1	0	1
Total.	128	7	78	1	8	34

L'étude du tableau VII est intéressante. Sur 128 souches de streptocoques non groupables :

94 rentrent dans la classification que nous avons suivie, avec un très grand nombre de *St. pneumoniae* (78 souches) ;

34 souches restent inclassées et la proportion de germes inclassables est plus grande lorsqu'il s'agit de prélèvements bron-

chiques, d'examen de pus divers, que pour les germes d'autres origines.

Ces résultats sont bactériologiquement satisfaisants et seule la trop forte proportion de *St. pneumoniae* nous paraît discutable. Nous pensons que l'absence de culture sur milieu enrichi d'éthylhydrocuprine est un caractère trop banal pour en faire la base d'une distinction de variété de streptocoques non groupables.

Si nous supprimons, dans les colonies α , la variété dite *St. pneumoniae* de nos résultats, nous obtenons :

Streptocoques non groupables	128 souches
Classés { <i>St. agalactiae</i>	7
{ <i>St. sanguinis</i>	1
{ <i>St. salivarius</i> (ou <i>hominis</i>)	8
Total	16 souches
Inclassés	112 souches

Ce résultat nous semble plus proche de la réalité et concorde davantage avec les chiffres bactériologiques classiques qui reconnaissent peu de variétés identifiables, en dehors des groupes sérologiques, parmi les streptocoques.

DISCUSSION.

Nous avons étudié par le « grouping » de Lancefield 217 souches de streptocoques d'origine humaine et classé sur ce nombre 89 souches.

Nous avons pu voir que :

Les streptocoques β nous donnent une forte proportion de souches groupables (70 p. 100) avec une grande fréquence du groupe A (42,5 p. 100).

Les streptocoques α ont donné 32,4 p. 100 de souches groupables, parmi lesquelles 17,7 p. 100 de groupe D et le reste (14,7 p. 100) réparti sur les autres groupes *excepté* A, B et C.

Les streptocoques $\alpha + h$ ne nous ont donné que 30 p. 100 de souches groupables, réparties sur tous les groupes *excepté* A, B et C.

Les streptocoques γ donnent 50,9 p. 100 de souches groupables, parmi lesquelles 40,7 p. 100 de groupe D. Les autres souches (10,2 p. 100) se répartissent sur tous les groupes, *sauf* A, B et C.

Ces résultats nous montrent bien que les streptocoques des groupes A, B et C sont toujours des streptocoques hémolytiques (β).

Pour tous les autres groupes de Lancefield, allant de D jusqu'à N, tous les aspects sur gélose au sang ont été rencontrés, ce qui nous a surpris pour les groupes autres que D.

Il est en effet connu que les streptocoques du groupe D peuvent avoir des colonies α , β ou γ ; mais tous les traités présentent les

autres streptocoques groupables comme toujours hémolytiques. Or, parmi nos 29 souches groupables ne faisant pas partie de A, B, C et D, 1 seule est β hémolytique (groupe H), 13 sont $\alpha + h$, 10 sont α et 5 sont γ .

Il aurait été certainement intéressant d'établir les types de Griffith parmi ces streptocoques groupables. Mais nous sommes obligés de constater que le « typing » n'aurait rien changé à la plus grande de nos difficultés de classification, qui est constituée par le nombre important de souches de streptocoques inclassables par la méthode de Lancefield.

Les réactions biochimiques habituelles nous ont paru extrêmement intéressantes pour le groupe D (entérocoques). La fixité de leurs réactions biochimiques est remarquable, ainsi que la correspondance presque constante avec l'aspect typique de la colonie sur gélose au sang. Nous n'avons trouvé que 3 exceptions sur 38 souches, tant pour les réactions biochimiques que pour l'aspect de la colonie.

Il est intéressant de comparer ce que donnent les réactions dites d'identification des entérocoques parmi les streptocoques du groupe D et parmi les autres streptocoques en général.

SUR 38 SOUCHES D

SUR 179 SOUCHES
(excepté D)

35	bile (+)	18
3	bile (—)	161
35	chaleur (+)	11
3	chaleur (—)	168
35	ClNa (+)	12
3	ClNa (—)	167
35	esculine (+)	18
3	esculine (—)	161
35 ont une colonie typique d'entérocoque.		

Si l'on calcule les pourcentages correspondant à ces chiffres, la première impression est que :

90 p. 100 environ des souches du groupe D donnent des réactions d'identification positives ;

10 p. 100 environ des souches du groupe D donnent des réactions d'identification négatives ;

Pour les autres streptocoques, les faits sont exactement contraires : 90 p. 100 environ donnent des réactions négatives et 10 p. 100 environ des réactions positives.

En réalité, parmi les 10 p. 100 de D atypiques, nous rencontrons très souvent les mêmes germes, ce qui diminue d'autant le nombre réel des entérocoques à réactions biochimiques atypiques.

Par contre, pour les streptocoques des autres groupes comme pour les non groupables, les réactions atypiques sont très dis-

persées. Chaque streptocoque n'a guère qu'une réaction « d'entérocoque » positive, ce qui, pratiquement, n'entraîne jamais de difficultés d'identification.

L'ensemble de ces réactions biochimiques d'identification reste donc nécessaire à la reconnaissance presque certaine des streptocoques du groupe D par les épreuves culturelles. L'une ou l'autre de ces réactions, isolée, n'a pas de valeur (en particulier la fermentation de l'esculine trop souvent considérée jusqu'ici comme un caractère suffisant pour reconnaître un entérocoque).

Pour les autres souches groupables, les réactions biochimiques, bien que régulières pour un même groupe, ne nous ont fourni aucune précision complémentaire. Dans ce cas, le « typing » dans le groupe est évidemment d'un grand intérêt.

Pour les *streptocoques non groupables*, les résultats de l'étude biochimique ont été intéressants. Ils nous ont permis de vérifier tout d'abord que les germes venant d'un même malade ont des réactions identiques, même si ces souches sont inclassables par les moyens actuels.

Nous avons pu, sur 128 souches de streptocoques non groupables, en identifier 16. Ce résultat est appréciable en raison de la simplicité des épreuves à mettre en œuvre et, en le considérant comme une étape vers une classification plus complète, nous pensons que ce travail d'identification peut être utile en bactériologie médicale.

RÉSUMÉ.

Etude sérologique par le groupage de Lancefield de 217 souches de streptocoques humains montrant la forte proportion de germes non groupables, et étude biochimique mettant en évidence la très grande homogénéité des entérocoques et rapportant une application d'une tentative de classification pour les streptocoques non groupables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. ANDRIEU, L. ENJALBERT et L. LAPCHINE. *Ces Annales*.
- [2] R. F. SELBIE et coll. *British med. J.*, 1949, **2**, 662.
- [3] S. M. WHEELER et G. E. FOLEY. *Am. J. Dis. Childr.*, 1945, **70**, 207.
- [4] K. E. THULIN. *Acta path. microb. Scand.*, 1948, **75**, 135.
- [5] H. F. SWIFT. *Bacterial and mycotic Inf. Man*, Lippincott, 1952.
- [6] G. E. FOLEY. *New England J. Med.*, 1947, **237**, 809.
- [7] G. E. FOLEY et S. M. WHEELER. *J. Bact.*, 1943, **46**, 391.
- [8] H. GRAUDAL. *Acta pathol. microb. Scand.*, 1952, **31**, 46.
- [9] M. E. SHARPE et P. SHATTOCK. *J. gen. Microbiol.*, 1952, **6**, 150.
- [10] TAMBAY-RAFIC. *Thèse Méd.*, Lyon, 1952.
- [11] E. MUNCH-PETERSEN et R. CHRISTIE. *J. Path. Bact.*, 1947, **61**, 367.

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION SPONTANÉE DE PHAGES PAR LE BACILLE LYSOGÈNE DE LISBONNE

par J. BEUMER. (*)

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

On doit à Lwoff et à ses collaborateurs [1] une connaissance précise des conditions dans lesquelles les bactéries lysogènes se lysent et libèrent des quantités considérables de phages, sous l'action des agents inducteurs. On suppose que ces derniers provoquent, chez la majorité des bactéries lysogènes de la culture, la transformation du prophage en phage actif, phénomène qui ne se produit spontanément que chez un petit nombre de bactéries dans les cultures lysogènes non induites. On ignore à peu près tout des conditions dans lesquelles quelques individus d'une culture bactérienne lysogène libèrent spontanément des phages. Or, nous avons constaté précédemment [2] que le bacille lysogène de Lisbonne produit spontanément beaucoup moins de phages dans un milieu défini (B cyt) qu'en bouillon. Cette particularité nous a paru fournir l'occasion d'étudier l'influence de la composition du milieu de culture sur la production des phages par une bactérie lysogène.

Dans une communication au VI^e Congrès International de Microbiologie [3], nous avons brièvement rendu compte de nos premiers résultats ; nous avons poursuivi nos recherches et nous exposons ici l'ensemble des résultats obtenus.

TECHNIQUE.

Souches : Notre souche de bacille lysogène de Lisbonne [B. Lisbonne (H+) (H—) (V)] produit trois phages appelés par nous H+, H— et V, dont les caractères ont été décrits précédemment [4]. La souche de *Shigella dysenteriae* « B. Flexner 6 », sensible aux trois phages du B. Lisbonne, a été utilisée pour la détection et le titrage de ces phages.

(*) Manuscrit reçu le 6 septembre 1954.

Sérums anti-phages : Des sérums ont été préparés chez le lapin par injections intraveineuses et sous-cutanées de chacun des trois phages H+, H— et V. Les sérums anti-phages obtenus ont été débarrassés des agglutinines anti-bactériennes par contact avec des suspensions épaisses de B. Flexner 6. Ces sérums distinguent nettement les trois phages ; les réactions de neutralisation croisée que l'on observe sont faibles et peu gênantes.

Milieux : Notre bouillon nutritif est un bouillon de viande de bœuf, auquel on ajoute 0,5 p. 100 de Bacto-peptone Difco et 0,5 p. 100 de Protéose-peptone n° 3 Difco ; son pH est de 7,4.

Le milieu défini B cyt contient pour 100 ml d'eau distillée : 0,7 g PO_4HK_2 ; 0,1 g NO_3NH_4 ; 0,1 g SO_4Na_2 ; 0,3 g NaCl ; 0,25 g asparagine ; 1 ml glycérine ; 0,25 g lactate d'ammonium et 0,004 g cytidine (indispensable à la croissance du B. Lisbonne [2]) ; son pH est amené à 7,2-7,4.

Croissance des cultures microbiennes : Elle est suivie soit par turbidimétrie à l'absorptiomètre Spekker, soit le plus souvent par néphélométrie au néphocolorimètre Coleman. Dans ce dernier cas, les cultures sont faites dans des cuvettes calibrées contenant 10 ml du milieu étudié et maintenues au bain-marie à 37° ; des mesures néphélométriques effectuées à intervalles réguliers permettent d'établir la courbe de croissance.

Production des phages : Des fractions de 0,5 ml de culture sont prélevées aux temps choisis et centrifugées immédiatement pendant dix minutes à 6 000 tours/min. Les liquides surnageants sont étalés à la dilution convenable sur gélose contenant 1 p. 1 000 CaCl_2 en boîte de Petri, selon le procédé de la double couche, dû à Gratia [5], en utilisant la souche Flexner 6 comme germe sensible : le nombre de taches multiplié par le facteur de dilution donne le titre des phages libres dans un volume déterminé du surnageant non dilué, généralement 1 goutte de pipette Pasteur de calibre uniforme.

PRODUCTION DU PHAGE H— EN MILIEU DÉFINI B CYT.

Dans les cultures en bouillon, le B. Lisbonne libère 1 particule de H— pour environ 50 à 100 bactéries vivantes. Il libère beaucoup moins de phages H+ et V, puisque sur 1 000 particules de phage libérées en bouillon, environ 950 sont du type H—, 40 à 50 du type V et 5 à 10 du type H+. Cette prépondérance du phage H— dans les cultures nous a fait nous attacher d'abord à l'étude de la production de ce phage.

On sait que la souche lysogène *B. megatherium* 899 perd définitivement son caractère lysogène par des passages répétés en milieu synthétique (Clarke [6] ; Lwoff et Siminovitch [7]). Il n'en va pas de même pour notre souche de B. Lisbonne, qui reste lysogène après plus de 50 passages en milieu défini B cyt [2]. Mais on constate que, dès le premier passage dans ce milieu, le B. Lisbonne produit cent à mille fois moins de phage H— qu'en bouillon. La production spontanée de ce phage semble donc

dépendre de la composition du milieu de culture ; il reste à déterminer quels sont les facteurs qui exercent une influence sur cette production et le mécanisme de leur action.

I. CROISSANCE MICROBIENNE ET PRODUCTION DE H —. — La croissance du B. Lisbonne n'est ni aussi rapide ni aussi abondante en B cyt qu'en bouillon (figure 1). La pauvreté relative de la culture dans le milieu défini est en elle-même une cause du

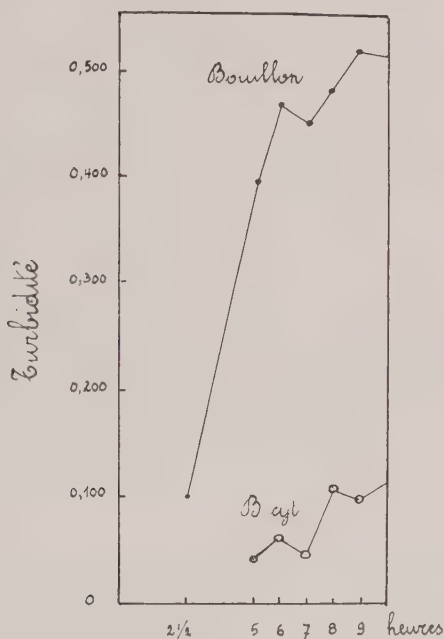


FIG. 1. — Croissance du B. Lisbonne en bouillon et en B cyt.

déficit de production du phage H — dans ce milieu. Mais, alors que la densité microbienne en B cyt, mesurée par turbidimétrie, vaut 10 p. 100 de celle observée en bouillon après cinq heures, 22 p. 100 après huit heures et 76 p. 100 après vingt-quatre heures, la production de phage H — libre en B cyt ne dépasse pas 1 p. 100 de la production en bouillon. Le défaut de libération du phage H — en B cyt est donc considérablement plus grand que le déficit de croissance de la culture, lequel ne suffit pas à expliquer la faible production de phage libre dans le milieu défini. On constate d'ailleurs que l'addition au milieu B cyt de 10 p. 100 de bouillon nutritif, bien qu'elle rende la croissance

des bactéries comparable à ce qu'elle est en bouillon, n'augmente que faiblement le titre du phage H — libéré. La production de phages libres par les bactéries paraît donc exiger des substances différentes de celles nécessaires à la croissance microbienne.

Pour comparer la production de phage H — dans les cultures en milieu défini à ce qu'elle est dans les cultures en bouillon, il est nécessaire, en raison de la différence de richesse de ces cultures, de rapporter le titre du phage à une même densité microbienne. Le titre du phage dans une culture donnée est donc corrigé, en le rapportant à une densité microbienne de 100 unités néphélométriques, selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Titre du phage} \times 100}{\text{Densité microbienne en unités néphélométriques}} = \text{Titre corrigé.}$$

La comparaison des titres ainsi corrigés montre qu'à densité microbienne égale la production du phage H — en B cyt vaut de 0,1 à 2 p. 100 de la production en bouillon.

II. EFFET SUR LA PRODUCTION DE H — DE L'ADDITION DE SUBSTANCES DIVERSES AU MILIEU B CYT. — Nous avons cherché à obtenir en B cyt une production de phage H — libre égale à celle que l'on observe en bouillon, en ajoutant au milieu défini des substances très diverses. Un certain nombre d'entre elles nous ont donné des résultats favorables ; ce sont par ordre d'efficacité croissante :

1° L'hydrolysât de caséine sans vitamines Difco (1,2 p. 100).

2° L'extrait de viande préparé selon Beumer-Jochmans [8], à la concentration de 10 p. 100 :

500 g de viande de bœuf finement hachée sont mis à macérer à froid pendant plusieurs heures dans 1 l d'eau ; la macération est isotonisée par addition de 5 g NaCl et portée à l'ébullition jusqu'à cuisson de la viande ; le bouillon obtenu est filtré, amené à pH 7 et stérilisé par filtration sur filtre Seitz.

3° L'extrait de levure préparé selon Dirkx [9], à la concentration de 10 p. 100 :

On suspend 200 g de levure fraîche de boulanger dans 200 ml d'eau distillée, on porte à l'autoclave à 120° pendant une heure, centrifuge pendant vingt minutes à 6 000 tours/min. et stérilise le liquide surnageant à 110°.

4° La Bacto-peptone Difco, à la concentration de 0,9 p. 100.

Comme le montre le tableau I, l'addition au B cyt de substances complexes, telles que la Bacto-peptone, l'extrait de levure ou l'extrait de viande permet dans ce milieu une production de

TABLEAU I. — Libération du phage H — exprimée en pourcentage du phage libéré en bouillon.

Milieux			Phage H- libéré
Boyt			au max. 1 p.100
-	+ hydrolysât de caséine	1,2 p.100	4 à 8 p.100
-	+ extrait de viande	10 p.100	50 p.100
-	+ extrait de levure	10 p.100	50 à 80 p.100
-	+ bacto-peptone	0,9 p.100	> 100 p.100

phage H — libre, du même ordre que celle observée en bouillon, allant de 50 p. 100 de celle-ci pour l'extrait de viande à plus de 100 p. 100 pour la Bacto-peptone.

L'addition d'hydrolysât de caséine, bien que favorable, n'exerce toutefois qu'une action beaucoup plus faible que celle des substances précédentes et aucun des dix-sept acides aminés, que nous avons essayés isolément, ne favorise la production du phage H — en milieu B cyt.

Le ribonucléate de soude, l'aneurine, la nicotinamide et un mélange des diverses vitamines du groupe B ne favorisent pas davantage la production de H —.

La libération du phage H — par le B. Lisbonne dépend donc nettement de la composition du milieu de culture. Les substances qui la favorisent paraissent de nature complexe : présentes dans le bouillon, la peptone, l'extrait de viande ou de levure, elles n'ont pu être remplacées par les substances définies que nous avons essayées.

III. TRANSFERTS DE CULTURES EN PÉRIODE DE CROISSANCE LOGARITHMIQUE. — Afin de déterminer comment la composition du milieu de culture influence la production du phage par la bactérie lysogène, nous avons eu recours au transfert en bouillon de bactéries cultivées au préalable en milieu B cyt et réciproquement, le transfert s'effectuant dans chaque cas pendant la période de croissance logarithmique.

Des cultures de B. Lisbonne en milieu B cyt, âgées de 4 heures, sont centrifugées et lavées deux fois en eau physiologique, puis transférées en milieu neuf, soit en bouillon, soit en B cyt. Des bactéries cultivées au préalable en bouillon sont de même transférées en milieu B cyt et en bouillon. Des titrages de phage H — libre sont effectués avant le transfert et d'heure en heure après le transfert (tableau II).

Lorsqu'on remet en bouillon des bactéries cultivées au préalable dans ce milieu, elles produisent du phage H — en abondance, comme elles le faisaient précédemment. Par contre, les bactéries venant de B cyt ne se mettent que lentement à produire de grandes

TABLEAU II. — Production de phage H — dans les cultures de B. Lisbonne après transfert.

Bactéries		Titre du phage H— après transfert (1)					
cultivées en	transférées en	0 h.	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	24 h.
Bcyt	Bcyt	412	17	55	42	30	140
"	Bouillon	4	470	3.470	4.800	9.200	5.130
Bouillon	Bcyt	4.170	166	139	50	46	70
"	Bouillon	17.300	34.500	24.200	26.000	31.200	17.500

(1) Il s'agit du titre corrigé.

quantités de phage lorsqu'on les transfère en bouillon : la production massive de phage H — ne s'amorce que deux heures environ après le transfert et n'atteint après quatre heures que le tiers de la production des bactéries venues du bouillon.

D'autre part, les bactéries cultivées en bouillon libèrent encore abondamment du phage H — lorsqu'on les transfère en B cyt, mais cette libération cesse rapidement et, dès la trentième minute, la majorité du phage libéré en B cyt au moment du transfert a disparu.

Nous avons répété ces expériences de transfert en remplaçant le bouillon par du milieu B cyt additionné de 10 p. 100 d'extrait de viande, dans lequel la production du phage H — atteint environ 50 p. 100 de la production en bouillon, afin d'opérer dans deux milieux très semblables, ne différant entre eux que par la présence d'extrait de viande. Comme dans l'expérience précédente, les bactéries cultivées en milieu B cyt ne commencent à libérer du phage H — en abondance que deux heures environ après leur transfert en B cyt + extrait de viande, alors que les bactéries venant de ce dernier milieu produisent d'emblée une quantité de phage H — du même ordre que celle qu'elles produisaient avant leur remise en suspension en B cyt + extrait de viande. D'autre part, les bactéries venues de B cyt + extrait de viande cessent rapidement de produire du phage en abondance lorsqu'on les transfère en B cyt.

Ces expériences mettent en lumière deux faits importants : le premier, le délai d'environ deux heures, nécessaire aux bactéries venant du milieu B cyt pour amorcer une production abondante de phage H — lorsqu'on les transfère en bouillon ou en B cyt + extrait de viande, et le second, la chute brusque de la libération de phage H — par les bactéries venues du bouillon ou de B cyt + extrait de viande, lorsqu'on les transfère en B cyt, ainsi que la disparition rapide des phages initialement libérés dans ce milieu. Ces faits paraissent indiquer que le milieu B cyt manque de substances nécessaires à la synthèse du phage H — par les bactéries : transférées dans des milieux contenant ces substances, les bactéries cultivées en milieu B cyt ne libèrent de

phage H — en abondance qu'après le temps nécessaire à sa synthèse. D'autre part, les bactéries cultivées au préalable en bouillon ou en B cyt + extrait de viande libèrent au moment de leur transfert en B cyt les phages élaborés précédemment, puis cessent d'en synthétiser abondamment de nouveaux par pénurie des facteurs indispensables à cette synthèse. Enfin, la disparition rapide dans le milieu B cyt du phage libéré par les bactéries venues du bouillon suggère la présence dans le milieu défini de substances toxiques pour le phage H — : c'est ce que les expériences suivantes ont démontré.

IV. TOXICITÉ DE CERTAINS IONS POUR LE PHAGE H —. — Si l'on dilue du phage H — dans différents milieux et que l'on titre ces dilutions après trente, soixante et quatre-vingt-dix minutes, on constate qu'en milieu B cyt le nombre de particules actives décroît rapidement : 99 p. 100 d'entre elles sont inactivées en trente minutes (tableau III). Le milieu B cyt semble donc être extrêmement toxique pour le phage H —. Disons immédiatement que, contrairement à ce dernier, les phages H+ et V sont stables en B cyt pendant au moins deux heures.

TABLEAU III. — Destruction du phage H — en milieu B cyt.

Milieu	Nombre de particules actives après			
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.
Bouillon	3.900	3.400	2.160	3.100
Bcyt	1.600	12	6	10
E.P.	3.400	852	550	420
Bcyt + ext.viande	3.300	4.000	2.500	2.700
Bcyt + MgCl ₂	3.000	516	450	420
Bcyt + CaCl ₂	2.500	492	312	330

La toxicité du milieu B cyt pour H — est complètement supprimée par 10 p. 100 d'extrait de viande et diminuée par MgCl₂ 10⁻⁴ M ou CaCl₂ 5 × 10⁻⁴ M : en présence de l'un de ces deux sels, 20 p. 100 des particules de phage H — introduites dans le milieu survivent après trente minutes contre 1 p. 100 en leur absence.

Des expériences systématiques ont précisé que le constituant le plus toxique du milieu B cyt est le PO₄HK₂ à la concentration utilisée (M/25) ; viennent ensuite dans l'ordre le NaCl (M/20), le SO₄Na₂ (M/140) et la glycérine. Ces résultats sont conformes aux observations de Gratia [10], selon lesquelles les ions Na et K sont toxiques pour certains phages, dans les limites des concentrations utilisées dans le milieu B cyt. Cet auteur signale également que cette action toxique des ions Na et K est neutralisée par les ions Ca et Mg.

Tenant compte de ces résultats, le milieu B cyt a été modifié en supprimant la glycérine, en y ramenant la concentration du PO_4HK_2 à M/100, concentration non toxique pour le phage H — et cependant compatible avec la croissance des bactéries, et en y ajoutant des sels de Ca et de Mg. Le nouveau milieu défini ainsi obtenu (D2) se compose de : PO_4HK_2 M/100 ; NO_3NH_4 M/80 ; SO_4Na_2 M/142 ; NaCl M/20 ; asparagine, 0,25 p. 100 ; lactate d'ammonium, 0,25 p. 100 ; cytidine, 0,004 p. 100 ; CaCl_2 3×10^{-4} M et MgCl_2 2×10^{-4} M.

Le milieu défini D2 permet le développement du B. Lisbonne dans la même mesure que le B cyt et n'est pas toxique pour les phages qui y sont libérés : en effet, les phages H +, H — et V y sont stables pendant au moins vingt-quatre heures. Si l'on compare la production du phage H — en B cyt et en D2, on constate qu'elle est bien meilleure dans ce dernier milieu, sans toutefois dépasser 5 à 10 p. 100 de ce qu'elle est en bouillon. Bien que le milieu D2 ne soit pas toxique pour les phages libérés, il n'en demeure pas moins défavorable à la production du phage H — par le B. Lisbonne. Les éléments minéraux du milieu jouent donc un rôle important dans la conservation des phages libérés, mais ne paraissent exercer qu'une action secondaire sur leur production.

PRODUCTION DES PHAGES H +, H — ET V EN MILIEU DÉFINI D2.

Comme nous l'avons exposé en détail ailleurs [41], la forte prédominance du phage H — dans les cultures de B. Lisbonne (95 p. 100 des particules libérées en bouillon sont de ce type) oblige à user d'artifices pour le titrage des phages H + et V, beaucoup moins abondants. On y réussit toutefois soit en effectuant les titrages à deux dilutions différentes, soit mieux encore en neutralisant le phage H — par le sérum antiphage correspondant.

I. ETUDE DE LA PRODUCTION DES PHAGES H +, H — ET V EN D2. — L'expérience montre que dans un milieu donné, les quantités des phages H +, H — et V libérés par le B. Lisbonne varient suffisamment peu pour que l'on puisse considérer cette libération comme relativement constante et caractéristique du milieu, dans des circonstances définies. Le tableau IV permet de comparer les titres des phages libres dans 8 cultures parallèles ensemencées d'un même clone, dont 4 effectuées en bouillon et 4 en D2 [41]. Les écarts par rapport à la moyenne sont suffisamment faibles, pour que l'on puisse considérer que, dans un milieu donné, un nombre plus ou moins constant de bactéries se lyse en libérant des quantités de phages, qui varient assez peu d'une culture à l'autre.

TABLEAU IV. — Titres des phages libres dans les cultures de six heures.

Cultures en bouillon				Cultures en D2.			
Tube	H+	H-	V	Tube	H+	H-	V
N° 1	630	108.000	10.200	N° 1	162	2.700	90
- 2	1.080	84.000	5.100	- 2	168	2.340	100
- 3	670	64.000	6.600	- 3	192	1.620	120
- 4	1.160	96.000	9.600	- 4	180	2.100	140
Moyenne	884	88.200	7.875	Moyenne	175	2.190	112

Ce tableau montre également que dans cette expérience le clone de B. Lisbonne utilisé libère en moyenne soixante-dix fois moins de phage V, quarante fois moins de phage H— et cinq fois moins de phage H+ en milieu D2 qu'en bouillon. Le calcul des proportions relatives des trois types de phages sur 100 particules libérées indique que ces proportions varient :

En bouillon :

Pour H+ de 0,53 à 1,20. Moyenne = 0,91 p. 100
 Pour H— de 89,97 à 93,43. Moyenne = 90,95 p. 100
 Pour V de 5,67 à 8,95. Moyenne = 8,15 p. 100

En D2 :

Pour H+ de 5,50 à 9,95. Moyenne = 7,10 p. 100
 Pour H— de 83,85 à 91,45. Moyenne = 88,40 p. 100
 Pour V de 3,05 à 6,20. Moyenne = 4,50 p. 100

Les proportions relatives des trois types de phages libérés varient donc assez peu dans un même milieu, mais varient par contre très fort dans des milieux différents. Selon sa composition, le milieu de culture affecte différemment la production des différents phages du B. Lisbonne : en milieu D2, la répartition des types est différente de ce qu'elle est en bouillon, indiquant notamment que le milieu défini est nettement moins défavorable au phage H+ qu'aux deux autres.

Le déficit de libération des phages et la modification de leurs proportions relatives en milieu D2 pourraient être dus, à ce que ce milieu sélectionnerait des clones faiblement lysogènes pour les trois phages, ou plus particulièrement pour l'un d'entre eux. L'expérience suivante démontre qu'il n'en est rien [41].

On cultive parallèlement en bouillon et en D2 des colonies de B. Lisbonne, isolées soit sur milieu D2, soit en bouillon. Les différents clones isolés sur un même milieu peuvent présenter des différences quant aux quantités absolues et aux proportions relatives des trois phages qu'ils libèrent (tableau V). Mais, par ailleurs, on constate qu'en moyenne les clones isolés sur milieu D2 produisent en bouillon les trois phages en mêmes quantités et en mêmes proportions que les clones isolés en bouillon. Réci-

TABLEAU V. — Titres des phages dans les cultures de seize heures.

I. des colonies isolées sur gélose bouillon							
Colonies	cultivées en bouillon			V	cultivées en D2		
	H+	H-			H+	H-	V
N° 1	600	46.800	3.900		282	1.800	198
- 2	410	270.000	800		186	1.440	300
- 3	500	189.000	800		174	1.500	222
- 4	800	153.000	15.000		258	700	390
- 5	1.000	400.000	13.200		304	2.220	492

II. des colonies isolées sur gélose-D2							
Colonies	cultivées en bouillon			V	cultivées en D2		
	H+	H-			H+	H-	V
N° 1	670	72.000	4.020		120	1.500	432
- 2	780	60.000	4.380		282	1.080	252
- 3	600	135.000	2.400		246	4.860	414
- 4	640	51.000	3.300		318	1.800	216
- 5	1.000	153.000	4.100		420	7.020	360

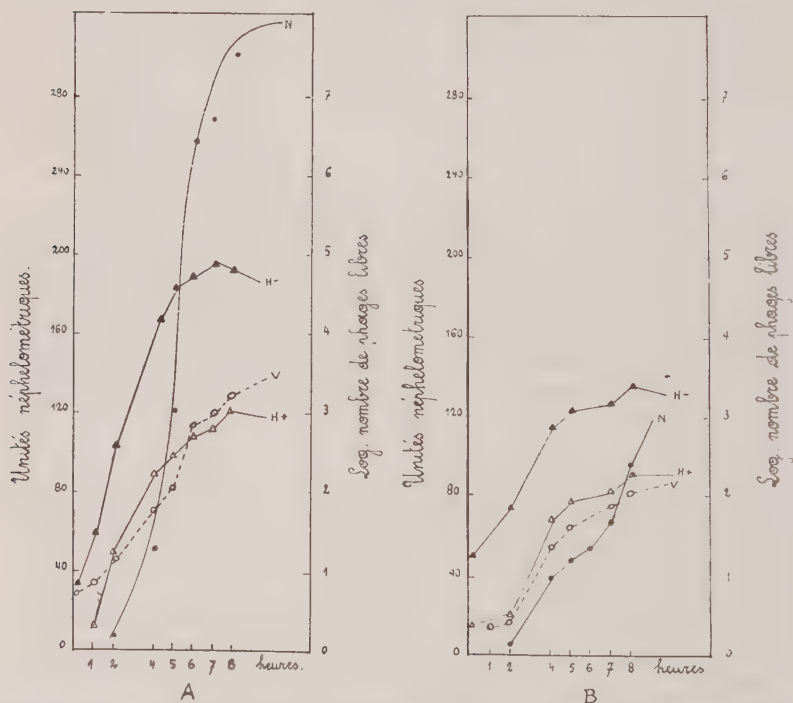


FIG. 2. — Croissance des cultures en unités néphélométriques (N) et production de phages libres : A, en bouillon ; B, en milieu D2.

proquement, le comportement en D2 des clones isolés en bouillon ne se distingue pas de celui des clones isolés sur milieu D2. Ce dernier ne sélectionne donc pas des individus héréditairement moins capables de libérer spontanément des phages.

II. PRODUCTION DES PHAGES ET CROISSANCE BACTÉRIENNE EN D2.

La croissance bactérienne a été suivie au néphélomètre et les phages libres titrés, parallèlement dans des cultures en milieu D2 et en bouillon, en fonction du temps (fig. 2) [11]. La croissance bactérienne est moins rapide et moins abondante en D2 qu'en bouillon : dans ce dernier, le maximum de développement est atteint entre sept et huit heures, alors qu'il ne l'est qu'entre dix-sept et vingt heures en D2, la densité microbienne ne dépassant pas dans ce milieu les deux tiers de celle observée en bouillon. Les titres des trois phages augmentent parallèlement à l'accroissement de la densité microbienne dans les deux milieux, la période de libération des phages coïncidant avec la phase de croissance logarithmique des bactéries. Pendant cette période, le titre corrigé d'un phage déterminé, c'est-à-dire le titre rapporté à une densité microbienne constante de 100 unités néphéométriques, varie relativement peu dans un même milieu (tableau VI).

TABLEAU VI. — Production des phages : titres corrigés.

Temps	Bouillon			Milieu D2		
	H+	H-	V	H+	H-	V
2 heures	320	7.320	280	60	1.460	60
4 -	320	24.600	100	121	1.660	63
5 -	200	28.000	83	172	2.400	87
6 -	187	18.800	255	100	1.170	40
7 -	220	26.000	320	139	2.030	97
8 -	335	19.500	500	202	2.530	114
23 -	172	12.300	700	121	635	98
30 -	134	22.000	520	84	400	53
48 -	82	9.640	455	36	255	116

Ceci semble indiquer que la libération des phages par les bactéries s'effectue en proportions constantes pendant la période de croissance microbienne ; elle cesse lorsque cette dernière prend fin. Les trois phages sont libérés en même temps, ce qui signifie qu'à tout moment des bactéries libèrent des phages de l'un ou de l'autre type, étant donné qu'une bactérie ne libère qu'un seul type de phage en se lysant (Bertani [12]). Comme la libération des phages en D2 s'effectue, de même qu'en bouillon, parallèlement à la croissance des bactéries, et en proportions constantes, tout semble indiquer que cette libération obéit aux mêmes lois en milieu D2 et en bouillon, à la différence près qu'elle est moins abondante en milieu défini et que la répartition des phages y est différente.

III. EFFET SUR LA LIBÉRATION DES PHAGES DE L'ADDITION DE DIVERSES SUBSTANCES AU MILIEU D2. — Le tableau VII [41] résume l'effet, sur la libération des trois phages, de l'addition au milieu D2 de glucose (0,0125 M), d'hydrolysât de caséine (1,2 p. 100), d'extrait de viande (10 p. 100), d'extrait de levure

TABLEAU VII. — Libération des phages exprimée en pourcentage des phages libérés en bouillon.

Milieu	H+		H-		V	
	Série A	Série B	Série A	Série B	Série A	Série B
D2	39,10	40,40	5,16	10,30	11,90	7,20
D2+glucose	61	11,20	9,40	10,90	11	4,40
- +hydrolysât de caséine	35,40	48,60	20,35	22,70	31,90	41,60
- + extrait de viande	61	35,40	57,10	80,50	18,20	16,80
- + extrait de levure	47	49	81	76,50	12,10	9,41
- + bactopeptone	25,30	24,60	113,30	137	12,30	10,70
- + protéose peptone	17,20	7,20	79,50	86,60	33,50	20,34

(10 p. 100), de Bacto-peptone Difco (1 p. 100) ou de Protéose-peptone n° 3 Difco (1 p. 100). Les chiffres inscrits au tableau expriment la libération de chaque phage dans les divers milieux en pourcentage de la libération en bouillon ; la série A se rapporte à des titrages effectués dans des cultures de sept et vingt-quatre heures, la série B à des titrages dans des cultures de quinze et vingt et une heures, chaque chiffre étant la moyenne de plusieurs expériences.

Les substances étudiées influencent différemment la libération de chacun des phages. Celle du phage H + est la moins influencée par les modifications de la composition du milieu. On remarque toutefois que les peptones, et surtout la Protéose-peptone, gênent très nettement la production de ce phage ; signalons que la Protéose-peptone est toxique pour le phage H +, mais non pour les autres phages. Par ailleurs, l'extrait de viande favorise légèrement la production de H + ; le glucose également, mais le phage libéré disparaît partiellement, en raison de l'acidification du milieu.

La production du phage H — est considérablement favorisée par la Bacto-peptone, et à un degré moindre par la Protéose-peptone, les extraits de viande et de levure ; l'hydrolysât de caséine n'augmente que légèrement la production de ce phage. Cette substance est, par contre, celle qui agit le plus favorablement, avec la Protéose-peptone, sur la production du phage V, mais il faut remarquer que celle-ci n'est que difficilement améliorée par l'addition de ces substances au milieu D2 : le bouillon reste de loin le milieu le plus favorable à la libération du phage V.

On peut donc, en ajoutant au milieu D2 différentes substances complexes, favoriser la libération de l'un ou l'autre des

phages H +, H — ou V, selon la substance ajoutée. Nous avons tenté d'obtenir le même résultat par l'addition de substances définies.

Nous n'avons obtenu que des résultats négatifs avec les substances suivantes : acides ribo- et désoxyribonucléique ; cytidine, thymine, guanine, adénine ; thiamine, riboflavine, pantothénate, pyridoxine, acide para-amino-benzoïque, niacine, nicotinamide, biotine, inosite ; ions Cu et Fe.

Signalons que dans le milieu défini D2, enrichi par addition d'hydrolysats de caséine, de tryptophane et de bases puriques et pyrimidiques, la croissance du B. Lisbonne est la même qu'en bouillon, sans que la libération des phages y soit proportionnellement améliorée. De même l'agitation continue des cultures de B. Lisbonne en D2 et en D2 glucosé favorise notablement la croissance microbienne, mais n'améliore pas proportionnellement la libération des phages, qui paraît plutôt gênée par l'aération, à densité microbienne égale.

Nous avons obtenu de meilleurs résultats par l'addition au milieu D2 de l'un ou l'autre des 17 acides aminés que nous avons éprouvés (tableau VIII) [41]. La production du phage H + est

TABLEAU VIII. — Libération des phages exprimée en pourcentage des phages libérés en bouillon.

Libération des phages exprimée en pourcentage des phages libérés en bouillon			
Milieus		H+	H— V
D2		39	11 2,8
D2 + hydr.cas.	1,2 p.100	46	28 12,5
- + glycooolle	0,1 p.100	53	18 4,4
- + alanine	id.	49	16 4,1
- + sérine	id.	104	31 34,5
- + cystine	0,01 p.100	36	14 7
- + méthionine	0,17 p.100	55	35 2,6
- + thréonine	id.	69	14 2,9
- + valine	0,1 p.100	40	30 2,5
- + leucine	id.	35	10 2,3
- + isoleucine	id.	46	16 4,2
- + arginine	id.	64	6 2,9
- + lysine	0,03 p.100	64	38 6,2
- + glutamate	0,27 p.100	50	19 4,6
- + phénylalanine	0,06 p.100	53	27 6,4
- + tyrosine	0,0075 p.100	22	8 3,3
- + tryptophane	0,1 p.100	39	12 6,9
- + histidine	id.	45	17 5,7
- + proline	id.	38	12 3,5

N.B. — Les chiffres qui dépassent d'au moins 50% les pourcentages en milieu D2 ont été soulignés.

favorisée, en ordre décroissant, par la sérine, la thréonine, l'arginine et la lysine, celle du phage H — par la lysine, la méthionine, la sérine, la valine, la phénylalanine, le glutamate, le glycooolle et l'histidine ; celle du phage V par la sérine, la cystine, le tryptophane, l'histidine, la phénylalanine, la lysine, le glutamate, le

glycocolle et l'isoleucine. Deux de ces acides aminés seulement, la sérine et la lysine, améliorent nettement la production des trois phages ; trois autres, le glycocolle, le glutamate et la phénylalanine, augmentent à la fois la libération des phages H— et V. La production de chacun des phages est donc favorisée par l'addition au milieu défini d'acides aminés différents.

IV. TRANSFERT DE CULTURES EN PÉRIODE DE CROISSANCE LOGARITHMIQUE. — Nous avons répété en milieu D2 les expériences de transfert des cultures en phase de croissance logarithmique, telles que nous les avons effectuées en milieu B cyt. Comme on peut le voir (tableau IX), les bactéries cultivées en D2, comme

TABLEAU IX. — Production de phage H— dans la culture de B. Lisbonne après transfert.

Bactéries		Titre du phage H— après transfert (1)				
cultivées en	transférées en	0 h.	1 h.	2 h.	3 h.	18 h.
D2	D2	188	910	2.380	1.380	350
D2	Bouillon	191	1.950	13.400	18.200	12.000
Bouillon	D2	2.500	16.200	15.100	13.800	1.840
Bouillon	Bouillon	1.940	23.000	41.000	39.000	15.300

(1) Il s'agit du titre corrigé.

celles cultivées en B cyt, n'accroissent pas d'emblée leur production de phage H—, lorsqu'on les transfère en bouillon : ici aussi un délai de deux heures est nécessaire à l'élaboration du phage par les bactéries provenant d'un milieu carencé en substances nécessaires à cette synthèse. Les bactéries cultivées en bouillon libèrent en D2, au moment du transfert, sensiblement autant de phage H— qu'en bouillon, mais alors que ces bactéries continuent à produire des phages si on les replace en bouillon, elles cessent après une heure environ de produire de nouveaux phages lorsqu'on les transfère en milieu défini. Toutefois, le milieu D2 n'étant pas toxique, le phage H— libéré au moment du transfert ne disparaît pas dans la suite, contrairement à ce qui se passait en B cyt.

Les résultats sont comparables si la croissance préliminaire des cultures s'est effectuée en milieu D2 enrichi par addition d'hydrolysats de caséine, de tryptophane et de bases puriques et pyrimidiques, au lieu de D2 ; comme dans le milieu enrichi les bactéries se multiplient aussi rapidement qu'en bouillon, on évite l'écueil de comparer des cultures inégalement riches en germes.

Ces expériences, comme celles effectuées en B cyt, tendent à démontrer que le déficit de production des phages en milieu défini est dû à la pénurie en substances indispensables à la synthèse des phages par les bactéries.

CONCLUSIONS.

Il ressort des expériences exposées dans ce travail que la libération spontanée des phages par la bactérie polylysogène B. Lisbonne (H +) (H —) (V) est influencée par la composition du milieu de culture. Si, en effet, un même clone bactérien libère les trois phages H +, H — et V, en proportions relativement constantes dans des cultures parallèles effectuées dans le même milieu, par contre, dans des milieux différents, les quantités absolues et les proportions relatives des trois phages, que libère ce même clone, varient considérablement. C'est ce qu'illustre notamment la comparaison de la libération des phages en bouillon et dans le milieu défini D2, dans lequel le B. Lisbonne libère selon les clones de 2,5 à 10 p. 100 du phage H —, de 1,5 à 12 p. 100 du phage V et de 20 à 40 p. 100 du phage H + qu'il libère en bouillon.

La composition du milieu de culture conditionne la libération des phages, notamment par son influence sur la croissance des bactéries et sur la stabilité des phages libérés, mais surtout par son action sur la synthèse de ceux-ci.

Dans les différents milieux étudiés, le titre des phages libérés croît parallèlement à la culture microbienne, mais si l'on rapporte le nombre de phages libres à une densité microbienne constante, on constate que dans des milieux différents un même nombre de bactéries produit des quantités très variables des trois phages. Dans le milieu défini D2 additionné d'hydrolysât de caséine, de tryptophane et de bases puriques et pyrimidiques, la courbe de croissance du B. Lisbonne est la même qu'en bouillon et cependant les bactéries libèrent dix fois moins de phage H — dans le milieu défini qu'en bouillon. Ce n'est donc pas uniquement par son action sur la croissance bactérienne que la composition du milieu influence la production des phages.

Les phages libérés disparaissent plus ou moins rapidement dans certains milieux, dont un ou plusieurs des composants sont toxiques. C'est ainsi que le phage H — n'est pas stable en milieu B cyt, à cause de la toxicité des ions Na et K : 99 p. 100 des particules de ce phage sont inactivées en trente minutes dans ce milieu, qui contient un excès de PO_4HK_2 . De même, la Protéoseptone est toxique pour le phage H +, dont elle inactive 90 p. 100 des particules en huit heures. Toutefois, l'emploi de milieux définis, tels le milieu D2, dont la composition a été étudiée de telle manière qu'elle assure la stabilité des phages qui y sont libérés, montre que, même dans ces conditions, des différences considérables subsistent dans la production des trois phages dans des milieux différents. L'action toxique de certains constituants des milieux sur l'un ou l'autre des phages doit être prise en considération pour éviter la destruction des phages libérés, mais celle-ci

ne rend pas compte à elle seule des différences observées dans la libération des phages, dans des milieux de composition différente.

Les substances composant le milieu de culture peuvent agir spécifiquement sur la libération de l'un ou l'autre des trois phages du *B. Lisbonne*. C'est ce que démontre l'addition au milieu défini de diverses substances complexes ou d'acides aminés. La production de H^+ est favorisée par l'extrait de viande, le glucose, la thréonine et surtout par la sérine, celle du phage H — par les peptones Bacto- et Protéose, les extraits de viande et de levure et, parmi les acides aminés, surtout par la lysine, la méthionine, la sérine et la valine, celle du phage V , enfin, par l'hydrolysât de caséine, la Protéose-peptone et par plusieurs acides aminés, dont la sérine est le plus actif.

L'étude parallèle de la croissance microbienne et de la libération des phages montre que cette dernière se produit essentiellement pendant la période de croissance logarithmique des germes. L'expérience semble indiquer que, pendant cette période, dans un milieu déterminé, un même nombre de germes libère une quantité constante d'un phage donné. Ce taux de libération diffère, par contre, pour un même phage d'un milieu à l'autre : il est notamment beaucoup plus faible en milieu défini D2 qu'en bouillon, surtout pour les phages H — et V .

A quoi attribuer le déficit de libération des phages en milieu D2 ? L'expérience permettant d'éliminer la sélection par ce milieu de clones bactériens faiblement lysogènes, il reste deux hypothèses à envisager. Ou bien, en milieu D2, un plus petit nombre de bactéries se lyse spontanément en libérant la même quantité de phages qu'en bouillon, ou bien la fréquence de la lyse spontanée est la même dans les deux milieux, mais le rendement en phages de chaque bactérie est plus faible en D2 qu'en bouillon. La première hypothèse n'explique pas l'action spécifique de certaines substances sur la libération d'un type de phage déterminé. Puisque, selon Bertani [12], chez le *B. Lisbonne* chaque bactérie qui se lyse libère des particules de phage appartenant à un seul type, bien qu'elle soit potentiellement capable de les produire tous les trois, on comprendrait mal qu'une substance favorise exclusivement la libération d'un phage déterminé, si cette substance ne modifiait que le nombre des bactéries qui se lysent.

Les expériences de transfert de bactéries en période de croissance logarithmique apportent, par ailleurs, un argument de poids à la seconde hypothèse. Les bactéries cultivées en milieu défini ne libèrent de phages en abondance en bouillon que deux heures environ après leur transfert dans ce milieu, tandis que les bactéries cultivées en bouillon et transférées en milieu défini libèrent encore des phages en abondance au moment du transfert, mais cessent dans la suite d'en produire de nouveaux. Il ne

semble donc pas que le milieu défini gêne la libération proprement dite des phages, mais qu'il manque des matériaux nécessaires à leur synthèse. Il faut, par conséquent, aux bactéries transférées du milieu défini en bouillon un délai indispensable à l'assimilation des matériaux nécessaires à la synthèse des phages et le temps de réaliser cette dernière. Il semble donc que l'on puisse admettre que le faible rendement en phages des bactéries cultivées en milieu défini soit dû à la carence en matériaux nécessaires à la synthèse des phages et que les substances qui augmentent spécifiquement la libération d'un phage déterminé agissent en favorisant sa synthèse par les bactéries.

Cette conclusion est conforme, par ailleurs, aux résultats obtenus par divers auteurs. Cohen et Fowler [13] ont observé que le rendement en phages lors de la lyse d'*E. coli* B par le phage virulent T2 est dix à quarante fois plus faible en milieu synthétique qu'en bouillon et que certains acides aminés sont indispensables à la synthèse de ce phage par la bactérie. Les bactéries lysogènes induites ne se lysent pas et ne produisent pas de phages, si après l'induction elles sont carencées en glucides (Jacob [14]), en aliments azotés ou en certains acides aminés (Borek [15]). Gois et Hunt [16] ont observé de même que certains acides aminés sont nécessaires au développement des phages après induction d'*E. coli* K12 [λ] (1).

Il apparaît donc que, si nous ignorons encore les facteurs, qui dans une culture lysogène déterminent chez un certain nombre de bactéries la transformation, que nous appelons spontanée, du prophage en phage, suivie de la lyse bactérienne et de la libération des phages, le milieu de culture influence de manière certaine le nombre des phages libérés et, dans le cas d'une bactérie polylysogène, le type de ces phages, vraisemblablement grâce au rôle que jouent dans la synthèse de ceux-ci les substances qui composent ce milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LWOFF. *Bact. Rev.*, 1953, **17**, 269.
- [2] J. BEUMER et M. P. BEUMER-JOCHMANS. *Ces Annales*, 1953, **84**, 328.
- [3] J. BEUMER. *VI^e Congrès International de Microbiologie*, Rome, 1953.
- [4] J. BEUMER et M. P. BEUMER-JOCHMANS. *Ces Annales*, 1952, **83**, 582.
- [5] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1936, **57**, 652.
- [6] N. A. CLARKE. *J. Bact.*, 1952, **63**, 187.

(1) Notre mémoire était rédigé lorsque nous avons eu connaissance des expériences de S. R. Gross (*J. Bact.*, 1954, **68**, 43), indiquant que le phage T2 n'est pas reproduit par la souche *E. coli* K12 en milieu synthétique, à moins d'y ajouter de l'extrait de levure, du bouillon, de la digestion tryptique de caséine ou un mélange d'acides aminés.

- [7] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1937.
- [8] M. P. BEUMER-JOCHMANS. *Ces Annales*, 1951, **80**, 536.
- [9] J. DIRKX. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 719.
- [10] A. GRATIA. *Bull. Acad. Roy. Méd. Belgique*, 1940, **4**, 232.
- [11] J. BEUMER. *Bull. Acad. Roy. Méd. Belgique* (sous presse).
- [12] G. BERTANI. *J. Bact.*, 1951, **62**, 293.
- [13] S. S. COHEN et C. FOWLER. *J. Bact.*, 1948, **87**, 259 et 275.
- [14] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 433 et 578.
- [15] E. BOREK. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **8**, 211.
- [16] J. GOTS et G. HUNT. *J. Bact.*, 1953, **66**, 353.

ÉTUDE GÉNÉTIQUE D'UN BACTÉRIOPHAGE TEMPÉRÉ D'*ESCHERICHIA COLI*.

I. — LE SYSTÈME GÉNÉTIQUE DU BACTÉRIOPHAGE λ (*)

par F. JACOB et E.L. WOLLMAN (**).

(Service de Physiologie microbienne. Institut Pasteur.)

INTRODUCTION.

L'étude de la mutabilité des bactériophages et l'étude de leur recombinaison génétique ont apporté des renseignements essentiels quant à leur mode de reproduction. On sait en effet qu'après l'infection des bactéries sensibles, le bactériophage perd son pouvoir infectieux [1]. Pendant cette période d'éclipse, le matériel phagique en voie de multiplication peut encore être caractérisé par les éléments de sa constitution génétique. Les résultats les plus importants ont été fournis par l'étude des gros bactériophages virulents d'*Escherichia coli*, T2 et T4. Ils indiquent que, pendant la phase végétative, chaque particule formée conserve son intégrité génétique et peut, à son tour, servir de modèle à la formation d'autres particules [2]. Elle peut également participer à des phénomènes de recombinaison génétique qui obéissent dans leurs grandes lignes aux lois de la génétique classique [3, 4].

Les bactériophages tempérés diffèrent des gros bactériophages virulents par de nombreux caractères. Ils sont en particulier capables, à l'état de prophage, de réaliser une association étroite avec le matériel génétique de la bactérie [5]. Il semblait donc utile d'étudier le système génétique du bactériophage λ , dont l'association à l'état de prophage avec le matériel génétique des bactéries lysogènes d'*E. coli* K 12 (λ) a été démontrée [6, 7]. Déjà Murphy [8] a étudié la recombinaison génétique chez un bactériophage tempéré de *Bacillus megatherium*. Nous nous proposons de décrire, dans les trois mémoires de cette série, le système génétique du bactériophage λ , le mécanisme de la recombinaison

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du National Cancer Institute of the National Institutes of Health des Etats-Unis d'Amérique.

(**) Manuscrit reçu le 2 septembre 1954.

génétique chez ce bactériophage [9] et l'effet du rayonnement ultraviolet sur le processus de recombinaison [10].

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Souches de bactéries et de bactériophages. — La souche d'*E. coli* K12 et la plupart des mutants qui en dérivent sont lysogènes. Le bactériophage λ que ces bactéries produisent peut se multiplier sur d'autres souches (K12S) devenues non lysogènes après exposition au rayonnement ultraviolet [41]. La souche sensible 112 a été utilisée comme souche indicatrice [7].

Les caractéristiques du bactériophage λ ont été plusieurs fois décrites [12, 13].

Milieux. — Bouillon de viande + NaCl, 5 g/l.

Tampon : KH_2PO_4 , 1,36 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g ; $\text{Mg}(\text{SO}_4)7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g ; $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, 0,2 g ; eau, 1 000 g ; KOH, q. s. pour pH 7.

Milieu gélosé pour étalement : macération de viande, 100 ml ; peptone Uclaf, 10 g ; NaCl, 10 g ; gélose, 12 g ; eau, 900 g ; ajusté à pH 7. La gélose molle utilisée pour les étalements a la même composition mais contient seulement 7 g p. 1 000 de gélose.

Stocks de phages. — Les stocks de phages ont été préparés en émulsionnant une plage dans du bouillon en présence d'environ 10^7 bactéries/ml. Après plusieurs heures d'agitation à 37°, la préparation est centrifugée et le surnageant filtré. Les préparations ainsi obtenues titrent en général 0,5 à $2 \cdot 10^{10}$ particules/ml.

Étalement des bactériophages. — Pour que le phage λ produise des plages homogènes, il est nécessaire de le préadsorber sur des bactéries indicatrices avant étalement sur gélose. En pratique, 0,1 ml de la suspension de phages est ajouté à 0,25 ml d'une culture de bactéries indicatrices ayant terminé leur croissance exponentielle et contenant environ $2 \cdot 10^9$ bactéries/ml. La suspension est maintenue à 37° pendant vingt à vingt-cinq minutes, puis on ajoute 3 ml de gélose molle et le mélange est alors étalé sur la boîte de gélose. Pour obtenir des plages nettes et pour être à même de distinguer des plages de types différents, il est nécessaire que les boîtes de Petri aient un fond plat et que la couche de gélose soit épaisse de 1 cm environ.

LES PHÉNOTYPES DU BACTÉRIOPHAGE λ

1. — OBTENTION. — Le bactériophage λ , produit par les bactéries lysogènes K12 (λ), forme sur la souche sensible K12S de petites plages d'un trouble homogène, dont le diamètre est d'environ 0,5 mm. C'est ce bactériophage que nous appellerons type sauvage, car c'est de lui que proviennent la grande majorité des divers types de phages utilisés dans ce travail. La plupart d'entre eux sont apparus comme *mutants spontanés* dans des stocks de λ type sauvage ou de types mutants déjà isolés. D'autres types de λ sont des *mutants induits* par l'ypérite azotée ou par le rayonnement ultra-violet après traitement, soit des bactéries

seules [14], soit des bactéries et des phages [15]. D'autres enfin ont été obtenus comme *recombinants* au cours de croisements.

2. — CARACTÈRES PHÉNOTYPIQUES ÉTUDIÉS. — Les divers types obtenus diffèrent du type sauvage par un ou plusieurs des caractères suivants :

Dimension des plages. — Selon le diamètre des plages qu'ils forment, les différents phénotypes peuvent être classés en *petits* (1/2 à 1 mm), *moyens* (1 1/2 à 2 mm), ou *grands* (3 à 4 mm). Ces phénotypes, dont plusieurs sont représentés sur la figure 1, peuvent en général être distingués à l'examen direct. Leur identification peut, en cas de doute, être précisée par étalement simultané avec des particules d'un stock connu.

Aspect des plages. — Celles-ci peuvent être uniformément *troubles*, comme celles du type sauvage, leur centre seul peut être formé d'un semis de petites colonies entourées d'un anneau clair, donnant à la plage un aspect *centré*. Enfin, les plages peuvent être uniformément *claires*, parsemées seulement de rares colonies microscopiques distribuées au hasard à la surface de la plage.

Quels que soient la dimension ou l'aspect des plages formées par les divers types de λ , les bords de ces plages sont, en général, nettement délimités. Un phénotype a cependant été isolé qui forme des plages à contours *flous*.

Pouvoir lysogénisant. — La plupart des phages qui forment des plages troubles ou centrées sont, comme le type sauvage, capables de lysogéniser les bactéries sensibles. Certains d'entre eux cependant sont dépourvus du pouvoir lysogénisant [16]. Aucun des phénotypes clairs n'est capable de lysogéniser.

Pouvoir virulent inducteur. — Les bactériophages λ du type sauvage, ainsi que la plupart des mutants de λ , ne peuvent se multiplier chez les bactéries lysogènes K12 (λ) qui sont rendues *immunes* par la présence du prophage λ . Il en est ainsi, en particulier, de la grande majorité des mutants clairs. Certains d'entre eux, cependant, sont capables de se multiplier chez les bactéries lysogènes K12 (λ) [6] grâce à leur pouvoir de déclencher le développement du prophage homologue [13]. Ces mutants seront désignés sous le nom de *virulents inducteurs* (1).

(1) Dans une « définition de quelques termes relatifs à la lysogénie » [17], le caractère tempéré a été défini d'une manière positive comme « la capacité de donner des systèmes lysogènes ». Le caractère virulent n'a été défini que par opposition au caractère tempéré. On voit qu'une définition plus précise serait souhaitable, car il n'est manifestement pas possible d'englober sous la même dénomination les mutants troubles non lysogénisants de λ , les mutants clairs, les virulents inducteurs et les phages de la série T.

3. — PROPRIÉTÉS DES PHAGES λ . — Les principales propriétés du type sauvage paraissent, pour la plupart, être communes à l'ensemble des mutants de λ : même sensibilité à l'immun-sérum anti- λ et au rayonnement ultraviolet, même période latente (quarante-cinq minutes à 37°), même rendement moyen (80 à 130), sauf pour les mutants virulents inducteurs dont le rendement est

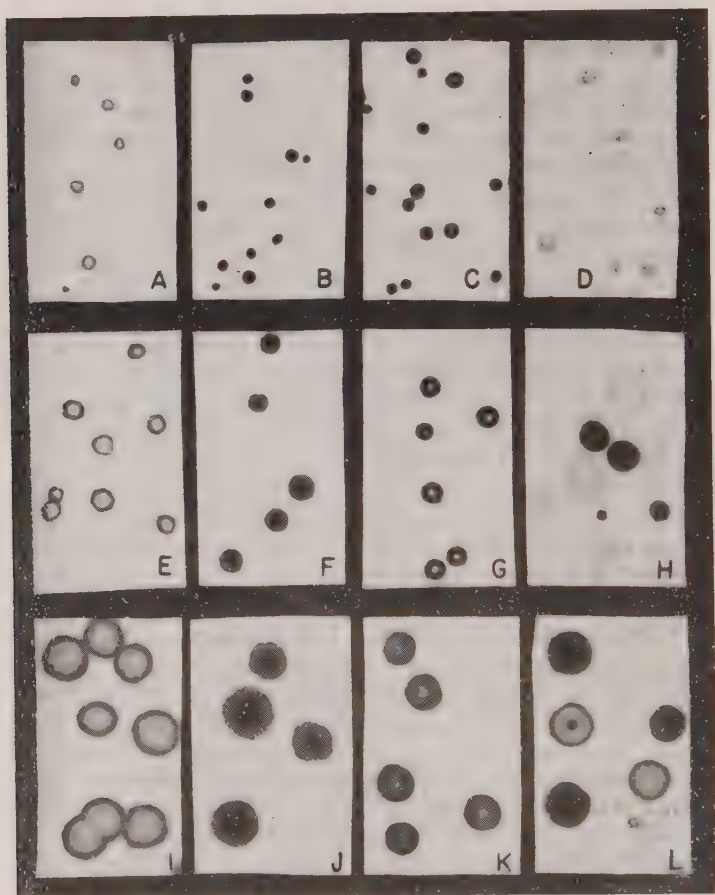


FIG. 1. — Aspect des plages que forment sur K12S le bactériophage λ et certains mutants. A : type sauvage; B : petit clair; C : petit centré; D : petit trouble; E : moyen trouble à m_5 ; F : moyen clair à m_5 ; G : moyen centré à m_5 ; H : phages clairs et phages virulents inducteurs étalés sur mélange d'indicateur. Les plages claires sont formées par les particules virulentes, les plages troubles par les phages clairs; I : grand trouble; J : grand clair; K : grand centré; L : plages formées au cours d'un croisement type sauvage \times grand virulent. La plage en forme de cocarde provient d'une particule diploïde hétérozygote.

supérieur (200 à 300). En infection mixte avec le type sauvage, la plupart des mutants s'adsorbent et se développent à la même vitesse que celui-ci : on retrouve les deux types dans la production dans des proportions analogues à celles qui ont servi à l'infection. Il n'en est cependant pas de même des virulents inducteurs qui possèdent un avantage sélectif. Si l'on infecte des bactéries sensibles avec un nombre égal de phages du type sauvage et du type virulent inducteur, on retrouve dans la descendance 90 p. 100 de phages du type virulent. Pour obtenir une production égale des deux types, il faut infecter par le phage virulent vingt minutes après l'infection initiale par le type sauvage. D'autres mutants de λ possèdent également, quoiqu'à un moindre degré, un avantage sélectif.

Enfin, des résultats inédits de Siminovitch indiquent que l'inactivation thermique des bactériophages λ peut varier suivant leur phénotype : le type sauvage, en particulier, est plus sensible que certains mutants *grands*.

RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE CHEZ LE BACTÉRIOPHAGE λ .

Lorsque deux bactériophages λ diffèrent par plus d'un caractère, leur développement simultané dans une même bactérie aboutit à la production des deux types parentaux et de types recombinants. Le bactériophage λ étant un phage tempéré, deux techniques de croisement peuvent être utilisées. D'une part, l'infection mixte de bactéries sensibles par les deux types de phages à croiser. D'autre part, la surinfection, par l'un des types, d'une souche lysogène pour l'autre type, préalablement induite par la lumière ultraviolette.

INFECTION MIXTE. — L'adsorption du bactériophage λ est assez lente en bouillon. Elle l'est également dans le tampon utilisé. Afin que la multiplication de l'ensemble des phages adsorbés commence simultanément dans l'ensemble de la population bactérienne, l'adsorption des phages à croiser est faite en bouillon additionné d'un inhibiteur du métabolisme énergétique, le cyanure de potassium [48], qui présente également l'avantage de diminuer la fréquence de lysogénisation.

En pratique. — Des bactéries K12S, en fin de croissance exponentielle ($5 \cdot 10^8$ à 10^9 bactéries/ml) en bouillon, sont centrifugées, lavées et mises en suspension en tampon à une concentration d'environ $2 \cdot 10^8$ bactéries/ml. A 0,5 ml de cette suspension bactérienne, on ajoute 0,1 ml d'un mélange en bouillon des deux phages à croiser, de manière à ce que la multiplicité d'infection soit de 10 à 30 particules de chaque type, et l'on complète à 1 ml avec du bouillon additionné de KCN (concentration finale M/250). Après vingt minutes d'adsorption

à 37°, le mélange est dilué 10^3 fois dans du sérum anti- λ (temps 0 de l'expérience). Après trente minutes de séjour à 37°, le tube de sérum est dilué 10^2 fois en bouillon à 37°. A partir de la quatre-vingt-dixième minute, la lyse est terminée et des échantillons, préalablement adsorbés sur les bactéries sensibles, sont étalés sur gélose.

Lorsque l'un des deux phages à croiser présente un avantage sélectif, la multiplicité initiale de ce phage ou le moment de son addition, sont choisis de manière que les deux types parentaux apparaissent dans la descendance dans des proportions identiques.

SURINFECTION DE BACTÉRIES LYSOGÈNES INDUITES. — On sait qu'après induction des bactéries lysogènes par le rayonnement ultraviolet, particules surinfectantes et particules issues du prophage peuvent se multiplier simultanément [13]. Une période de vingt minutes environ s'écoule entre le moment de l'irradiation et celui où le prophage entre dans la phase végétative. Cette période est suffisante pour permettre l'adsorption des particules surinfectantes avant la levée de l'immunité, assurant ainsi le développement simultané des deux types de particules. En ajustant de manière convenable la multiplicité du type surinfectant (de 3 à 5 particules pour la plupart des mutants), on obtient dans la descendance un nombre égal de particules appartenant à chacun des deux types parentaux.

En pratique. — Les bactéries lysogènes en fin de croissance exponentielle en bouillon (5.10^8 à 10^9 bactéries/ml) sont centrifugées, lavées et mises en suspension en tampon à une concentration d'environ 2.10^8 bactéries/ml. Cette suspension est alors exposée à la lumière ultraviolette de manière à ce que la dose reçue soit la plus petite qui induise le développement du phage dans plus de 90 p. 100 de la population (dose optima). Les bactéries irradiées sont diluées de moitié en bouillon (temps 0 de l'expérience) et à 0,9 ml de cette suspension on ajoute 0,1 ml d'un stock du phage à croiser titrant de 3 à 5.10^9 particules/ml. Après vingt minutes d'adsorption à 37°, le mélange est dilué 10^3 fois en sérum anti- λ . La fin de l'expérience est réalisée comme précédemment, l'étalement n'étant effectué qu'après cent vingt à cent cinquante minutes, car la lyse survient plus tardivement chez les bactéries lysogènes induites que chez les bactéries sensibles infectées.

GÉNÉRALITÉS SUR LES CROISEMENTS ENTRE PHAGES DIFFÉRANT PAR DEUX CARACTÈRES. — Un croisement mettant en œuvre deux phages λ différant par deux caractères, a été réalisé suivant les deux méthodes qui viennent d'être décrites. L'un des types parentaux forme des plages grandes et claires (g_1c), l'autre est le type sauvage qui forme des plages petites et troubles ($g_2^+c^+$). Quelle que soit la méthode utilisée, on trouve dans la descendance, outre les types parentaux, des types recombinants grands et

troubles (g_1c^+), et petits et clairs (g_1^+c), et ces deux types complémentaires apparaissent en proportions sensiblement égales (tableau I).

La fréquence de recombinaison observée, c'est-à-dire le rapport « (somme des deux types recombinants/somme des types parentaux et des types recombinants) », varie considérablement suivant la manière dont le croisement a été réalisé. Alors

TABEAU I. — Exemple de recombinaison entre deux caractères.

Méthode de croisement	Exp. n°	Types parentaux		Types recombinants		% de recombinants
Infection de K12S		g_1c	$g_1^+o^+$	g_1c^+	g_1^+o	
	1	882	774	51	46	5,5
	2	748	893	49	62	6,3
		g_1^+o	g_1c^+	$g_1^+o^+$	g_1c	
	1	539	652	41	51	7,1
	2	876	959	50	63	5,8
=====						
Surinfection de K12(λ^{++}) induit		g_1c	$g_1^+c^+$	g_1o^+	g_1^+o	
	1	661	738	139	116	15,7
	2	849	917	217	176	18,4

Ce tableau résume les résultats obtenus au cours de plusieurs croisements réalisés soit par infection de bactéries sensibles (couplage et répulsion), soit par surinfection de bactéries lysogènes préalablement induites par le rayonnement U.V.

qu'elle dépasse 15 p. 100 lorsque le croisement a été fait par induction, elle n'atteint que 6 p. 100 dans un croisement par infection (tableau I). Il a pu être démontré que l'accroissement de la fréquence de recombinaison que l'on observe avec des bactéries lysogènes induites est un effet du rayonnement ultraviolet qui peut être également observé dans un croisement par infection, après irradiation d'un seul ou des deux phages à croiser, ou après irradiation du complexe [40].

Pour une méthode donnée, la fréquence de recombinaison observée entre deux caractères donnés est la même, que le croisement soit fait par couplage ou par répulsion. On observe cependant, d'un jour à l'autre, des fluctuations importantes dans les résultats d'un même croisement réalisé dans des conditions identiques. On peut en voir trois exemples dans le tableau I.

DIPLOÏDES HÉTÉROZYGOTES. — Au cours de croisements entre les deux phages g_1c et $g_1^+c^+$, on observe, outre les types paren-

taux et recombinants, de rares plages (de l'ordre de 10^{-3}) qui diffèrent par leur aspect de chacun des types décrits. Ce sont de grandes plages qui présentent un aspect moucheté, avec des zones troubles et des zones claires. Ces plages ne sont pas formées par des bactéries encore non lysées, car on les retrouve même après lyse provoquée par le KCN. Lorsque ces plages sont reprises et réétalées, elles provoquent invariablement la formation de deux types de plages dont l'un correspond à un type parental et l'autre à un type recombinant. Des plages analogues apparaissent aussi dans les croisements entre plages à phénotype trouble et phages virulents inducteurs. Leur aspect est ici un peu différent : c'est un aspect « en cocarde », assez caractéristique, dont une illustration est donnée sur la figure 1 L.

Ces plages exceptionnelles correspondent vraisemblablement à des diploïdes hétérozygotes partiels, analogues à ceux qui ont été observés chez T2 par Hershey et Chase [19] et analysés par Levinthal [20]. La faible proportion dans laquelle ces particules apparaissent et la difficulté à les reconnaître dans la plupart des croisements n'ont pas permis une analyse quantitative.

ANALYSE GÉNÉTIQUE DE QUELQUES CARACTÈRES DE λ .

Parmi les mutants de λ que nous avons isolés, certains diffèrent phénotypiquement du type dont ils sont issus par un seul caractère, d'autres par plus d'un caractère. Les mutants présentant le même phénotype, mais indépendamment obtenus, ont été croisés entre eux et croisés au type sauvage afin d'établir s'ils différaient de celui-ci par un ou plusieurs caractères et si leur phénotype commun était sous la dépendance d'un même génotype. Les principaux caractères que nous avons analysés et l'origine des mutants qui les possèdent sont indiqués dans le tableau II, où l'on voit que les mutants spontanés de λ , qu'ils diffèrent phénotypiquement du type original par un ou plusieurs caractères, en diffèrent souvent génotypiquement par plusieurs.

Nous avons choisi comme λ type sauvage, le phage provenant d'une plage de la souche lysogène K12 (λ) Y10 [21]. Les caractères génétiques des différents phénotypes obtenus sont désignés par la première lettre de ce phénotype, suivie d'un numéro lorsqu'il existe différents déterminants non alléliques d'un même phénotype, ou lorsqu'un phénotype donné est sous la dépendance de plusieurs gènes.

La mesure des liaisons existant entre les différents caractères a été réalisée par la méthode de croisement habituelle par infection mixte. Les fréquences de recombinaison observées sont, comme il l'a été indiqué plus haut, variables d'un jour à l'autre. Chaque fois que cela a été possible, les mesures relatives de

distance ont été déduites d'expériences réalisées le même jour. Dans les autres cas, on a pris la moyenne de plusieurs expériences différentes. Les fréquences de recombinaison observées chez λ sont, en général, faibles. La méthode de croisement par induction (ou irradiation) qui accroît cette fréquence, a permis, dans certains cas, de dissocier et de localiser certains caractères très liés.

TABLEAU II. — Origine des principaux caractères étudiés.

N° du stock	Phénotype	Génotype	Origine
1	petit trouble	+	plage formée après induction de la souche Y10(λ) de K12
* A	petit trouble	ce ₂ v ₃ m ₃	plage formée après induction d'une souche K12(λ) prototrophe
4	petit clair	c	mutant spontané de 1
11	grand centré	lg ₁ ce ₁ ce ₂ v ₃ v ₄ m ₂ m ₃	mutant spontané de 1 A
12	grand virulent	lg ₁ ce ₁ ce ₂ v ₁ v ₂ v ₃ v ₄ m ₂ m ₃	mutant spontané de 11
25	grand trouble	lg ₁ ce ₂ v ₃ m ₃	recombinant du croisement 11 x 1 A
27	grand clair	lg ₁ ce ₂ v ₃ m ₃ c	mutant spontané de 25
34	petit trouble flou	fce ₂ v ₃ m ₃	étalement de 1 A sur bactéries traitées par l'ypérite azotée
166	moyen clair	m ₅ g ₁ ce ₂ v ₃ m ₃ c	mutant spontané de 1 A
205	moyen trouble	lm ₇ g ₁ ce ₂ v ₃ m ₃	mutant obtenu par étalement de 25 irradié sur bactéries irradiées
209	moyen clair	lm ₆ g ₁ ce ₂ v ₃ m ₃ c	mutant obtenu par étalement de 27 irradié sur bactéries irradiées
210	petit clair	lp ₄ g ₁ ce ₂ v ₃ m ₃ c	mutant obtenu par étalement de 27 irradié sur bactéries irradiées

Dans ce tableau est indiquée l'origine de certains mutants de λ chez lesquels sont apparus les caractères analysés dans ce travail. Ont été omis de ce tableau, les phages dérivés de ceux-ci par mutation ou recombinaison. Le génotype indiqué présente les caractères différents de ceux du type sauvage dont la présence à été établie.

Pour la présentation des résultats expérimentaux, il nous a semblé plus simple de considérer successivement les différentes classes de phénotypes de λ que nous avons obtenues, et de décrire brièvement, pour chacune d'elles, les renseignements fournis par l'étude de leur mutabilité et par l'analyse des croisements. De ces renseignements seront déduites les conclusions concernant le déterminisme génétique des différents phénotypes et les relations d'allélisme ou de liaison pouvant exister entre les différents facteurs analysés. A la fin de cette étude, on tentera d'établir une carte groupant les caractères génétiques individualisés chez le bactériophage λ .

1. — DIMENSION DES PLAGES. — Dans les stocks de λ type sauvage, on peut trouver des mutants *grands* avec une fréquence de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-4} . On n'y trouve par contre pas de mutants *moyens*. Dans les stocks des phages *grands*, on peut trouver (quoique ce soit manifestement plus difficile) des phages *petits*.

et des phages *moyens* avec une fréquence comparable. Enfin, il est possible d'isoler à partir de stocks de phages *moyens*, des mutants *petits* et des mutants *grands*. Ces mutations peuvent être représentées par un schéma tel que celui de la figure 2, où l'on voit que la mutation *petit* \rightarrow *moyen* ne s'effectue pas à une fréquence comparable à celle des autres mutations.

Divers mutants différant de λ sauvage par la dimension de leurs plages ont été croisés avec le type sauvage et entre eux.

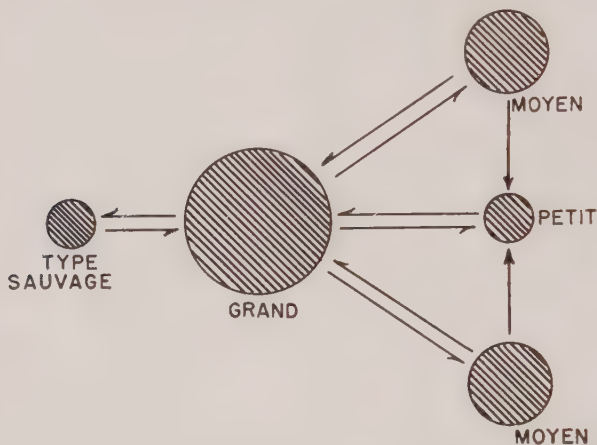


FIG. 2. — Schéma représentant les principales mutations affectant la taille des plages.

Les résultats de ces croisements, qui sont schématisés dans le tableau III, peuvent être résumés de la manière suivante :

a) Il existe un grand nombre de loci gouvernant la dimension des plages.

b) A chaque locus considéré individuellement, il existe, soit un allèle *p* (petit) ou *m* (moyen), capable de rétrécir le diamètre des plages, soit un allèle *+*, capable de déterminer une grande plage. Notre type sauvage, cependant, possède au locus 1 un allèle déterminant une plage petite (g_1^+), mais qui peut muter vers l'allèle g_1 .

c) Lorsque le génotype comprend un allèle petit à un locus quelconque (g_1^+ ou p_4), le phénotype est *petit*. En général, la présence d'un quelconque allèle *m* (en l'absence de tout allèle petit) détermine un phénotype *moyen*. Le phénotype *grand* n'est donc exprimé que si le génotype comprend, outre l'allèle g_1 , l'allèle *+* à chacun des autres loci de taille. En d'autres termes, tout allèle *petit* (g_1^+ ou p_4) est *épistatique* à tout autre caractère

TABLEAU III. — Croisements entre mutants différant par deux caractères affectant la dimension des plages.

	Types parentaux		Types recombinants discernables	% de recombinants x 2
G ^o P ^{oo}	m ₆ ⁺ m ₅	x m ₆ m ₅ ⁺	m ₆ ⁺ m ₅ ⁺ grand	3,1
G P	m ₅ ⁺ g ₁ ⁺	x m ₅ g ₁	m ₅ ⁺ g ₁ grand	1,4
G P	m ₆ ⁺ g ₁ ⁺	x m ₅ g ₁	m ₆ ⁺ g ₁ grand	3,9
G P	g ₁ ⁺ p ₄ ⁺	x g ₁ p ₄	g ₁ p ₄ ⁺ grand	9,4
G P	m ₆ p ₄ ⁺	x m ₆ ⁺ p ₄	m ₆ ⁺ p ₄ ⁺ grand	12,4
G P	m ₂ m ₀₃	x m ₂ ⁺ m ₀₃ ⁺	m ₂ m ₀₃ ⁺ moyen	1,9

G^o = génotype ; P^{oo} = phénotype

Expériences effectuées par infection des bactéries sensibles. Comme le plus souvent un seul des recombinants peut être distingué, la fréquence de recombinaison est obtenue en doublant la proportion observée de ce recombinant.

de dimension. Inversement, tout allèle *grand* (g₁ ou +) est *hypo-statique* à tout autre caractère de dimension (2).

A cette règle, il existe une exception. Les phages porteurs du gène m₂ et des allèles g₁ au locus 1 et + aux loci 4, 5, 6 et 7, ont bien un phénotype moyen en présence de l'allèle + au locus 3, mais ont un phénotype grand en présence de l'autre allèle m₀₃. Celui-ci agit donc comme un *modificateur* du gène m₂. La combinaison m₂ m₀₃ comme la combinaison m₂⁺ m₀₃⁺, détermine le phénotype *grand*.

(2) Le choix du phage produit par la souche Y10, comme type sauvage, complique la présentation de l'analyse des facteurs gouvernant la dimension des plages. Mais ce choix se justifie par le fait que c'est ce phage qui est à l'origine de la plupart des autres phénotypes étudiés, et qu'à l'exception de l'allèle g₁⁺, source de confusion, ce phage est porteur des allèles + des autres caractères étudiés.

d) Tous les loci prenant part au déterminisme de la dimension des plages paraissent disposés sur un même groupe de liaison. Les distances relatives de ces loci, exprimées par les fréquences moyennes de recombinaison observées, sont indiquées sur la figure 3.

2. — ASPECT DES PLAGES. — a) *Phénotypes trouble et clair.* — Dans les stocks du type sauvage et des autres phénotypes *troubles*, on peut trouver des mutants *clairs* avec une fréquence de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-4} . La mutation inverse, plus difficile à reconnaître, n'a pas été observée. Les croisements entre différents phages troubles, de même que les croisements entre différents phages clairs, ne nous ont jamais permis d'isoler des recom-

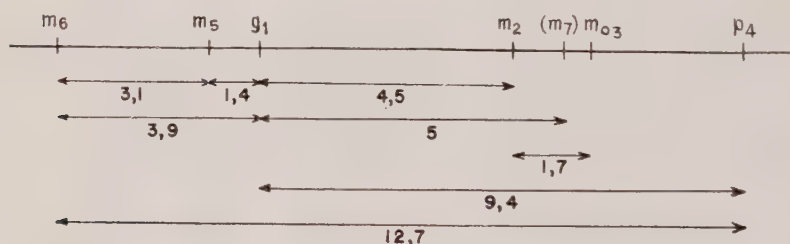


FIG. 3. — Représentation schématique des liaisons observées entre les caractères déterminant la taille des plages. Les chiffres représentent la fréquence de recombinaison moyenne observée entre deux paires de caractères (somme des deux recombinants/somme des parents et des recombinants) $\times 100$.

binants du type opposé. Nous considérons que les caractères *clair* (*c*) et *trouble* (*c*⁺) sont alléliques pour tous les phages λ que nous avons analysés.

b) *Phénotype flou.* — Les mutants formant des plages à bord flou diffèrent du type sauvage à un seul locus dont les allèles *f* et *f*⁺ déterminent le caractère flou ou net de la plage. Le phénotype flou n'est exprimé que chez les phages porteurs du caractère *g*₁⁺.

c) *Phénotype centré.* — Le phénotype centré est apparu chez un mutant spontané isolé d'un stock de λ type sauvage dont il différait par plusieurs caractères (tableau II). Dans les stocks préparés à partir de ce mutant $\lambda 11$, on trouvait des plages claires dont certaines sont du type *clair*, d'autres du type *virulent*. La mutation vers *trouble*, plus difficile à reconnaître, n'a pas été observée.

On peut démontrer que le phénotype centré est sous la dépendance de trois gènes (tableau IV). Les croisements entre phages centrés et phages troubles ne produisent que des phages ayant

les phénotypes des parents. Les croisements entre phages centrés et phages clairs produisent, outre les types parentaux, des recombinants troubles, avec une fréquence d'environ 1 p. 100. Ce résultat indique que le phénotype centré diffère du phénotype clair par au moins deux gènes dont l'un est le gène c^+ .

Un recombinant petit et trouble provenant d'un croisement entre un phage grand centré ($\lambda 11$) et un phage petit clair ($\lambda 4$) a été isolé et un stock préparé (croisement 1). Ce recombinant s'est révélé n'être pas différent du phage 1A du tableau II.

Si l'on croise un mutant clair du phage grand centré avec le type sauvage, on n'obtient que des recombinants *petit clair* et *grand trouble* (croisement 2). Si l'on croise le même mutant clair du grand centré avec un petit trouble type 1A, on obtient, outre les recombinants *petit clair* et *grand trouble*, des recombinants *grand centré* (croisement 3). Aucun autre phénotype clair en notre possession, croisé avec le recombinant type 1A, ne donne de recombinants *grand centré*. Il semblait donc évident qu'outre le gène c^+ , les mutants centrés portent deux gènes ce_1 et ce_2 , dont l'un est, dans le croisement 3, apporté par le parent grand clair et l'autre par le parent petit trouble. Cette hypothèse a été vérifiée en croisant 20 recombinants *grand trouble* du croisement 2 avec le recombinant *petit trouble* du croisement 1. Dans trois de ces croisements, on retrouvait des recombinants *grand centré* (croisement 4). Ces divers croisements sont résumés schématiquement dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Analyse du caractère centré.

Croisement	Types parentaux	Types recombinants fréquents (≈ 5 %)		Types recombinants rares (≈ 1 %)
1	$g_1ce_1c^+ce_2 \times g_1^+ce_1^+cce_2^+$ grand centré petit clair	$g_1ce_1^+cce_2^+$ grand clair	$g_1^+ce_1c^+ce_2$ petit centré	$g_1ce_1cce_2^+ + g_1^+ce_1c^+ce_2$ grand clair <u>petit trouble</u>
2	$g_1ce_1cce_2 \times g_1^+ce_1^+c^+ce_2^+$ grand clair type sauvage	$g_1ce_1c^+ce_2^+ + g_1^+ce_1cce_2$ grand trouble petit clair		$g_1ce_1c^+ce_2^+ + g_1^+ce_1^+cce_2$ <u>grand trouble</u> petit clair
3	$g_1ce_1cce_2 \times g_1^+ce_1^+c^+ce_2^+$ grand clair petit trouble	$g_1ce_1c^+ce_2^+ + g_1^+ce_1cce_2$ grand trouble petit clair		$g_1ce_1c^+ce_2^+ + g_1^+ce_1^+cce_2$ <u>grand centré</u> petit clair
4	$g_1ce_1c^+ce_2^+ \times g_1^+ce_1^+c^+ce_2^+$ grand trouble petit trouble	$g_1ce_1c^+ce_2^+ + g_1^+ce_1c^+ce_2^+$ grand trouble petit trouble		$g_1ce_1c^+ce_2^+ + g_1^+ce_1^+c^+ce_2^+$ <u>grand centré</u> petit trouble

On peut ainsi conclure que le phénotype centré n'est exprimé qu'en présence des trois gènes ce_1 , c^+ et ce_2 . Il diffère du type sauvage ($ce_1^+c^+ce_2^+$) par les deux gènes ce_1 et ce_2 , et des mutants clairs provenant du type sauvage ($ce_1^+c^+ce_2^+$) par les trois gènes ce_1 , c^+ et ce_2 . Il ne diffère par contre des mutants clairs auxquels il donne lui-même naissance ($ce_1c^+ce_2$) que par le gène c .

Les trois gènes ce_1 , c^+ et ce_2 se trouvent localisés dans une zone relativement étroite du groupe de liaison (figure 5). Les deux premiers ont été séparés par recombinaison, mais il n'a pas été possible de dissocier les gènes c^+ et ce_2 dont la distance n'excède pas 0,1 p. 100.

L'aspect centré des plages semble exprimer une modification du processus de lysogénisation qui aboutit à la formation de plages troubles chez les phages tempérés.

Tous les caractères affectant l'aspect des plages sont disposés sur un même groupe de liaison. Leur positions relatives sont indiquées sur la figure 5.

3. — POUVOIR VIRULENT INDUCTEUR. — Dans les stocks du mutant centré $\lambda 11$, on trouve régulièrement 10^{-6} particules du mutant virulent inducteur ($\lambda 12$). Ce mutant peut être aisément reconnu car il forme des plages sur les bactéries lysogènes K12 (λ), contrairement au type sauvage et aux autres mutants de λ . La mutation vers la virulence est une mutation extrêmement rare et n'a jamais été retrouvée, ni chez le type sauvage, ni chez aucun autre mutant que $\lambda 11$ ou les types qui en dérivent. Ce fait semble déjà indiquer que le phénotype virulent doit être dû à l'effet cumulatif de plusieurs gènes.

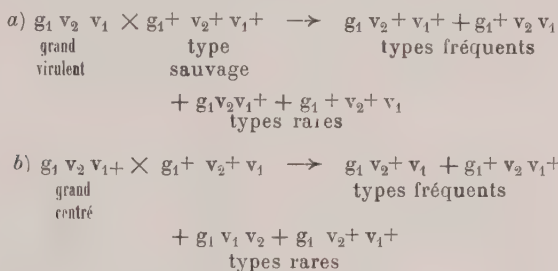
Le mutant virulent $\lambda 12$ isolé à partir de $\lambda 11$ ne semble pas être différent du mutant virulent décrit par E. et J. Lederberg [6] sous le nom de $\lambda 2$ (3).

Lorsqu'on croise $\lambda 12$ avec un quelconque phage clair, on n'obtient jamais de plages troubles. Ceci permet de conclure que l'un des composants du génotype virulent est un allèle de c et par conséquent de c^+ . En croisant le phage $\lambda 12$, qui forme sur K12S des plages grandes et claires, avec le type sauvage, on obtient dans la descendance, outre les types parentaux, les deux phénotypes recombinants *grand trouble* et *petit clair*. Les plages petites et claires ont été reprises et analysées pour leur capacité à produire des plages sur K12(λ) : 36 sur 382, soit 10 p. 100 de ces recombinants, ne formaient pas de plages sur K12(λ). Ils demeuraient cependant capables de muter vers le phénotype virulent à une fréquence d'environ 10^{-5} . Ils différaient

(3) Il semble vraisemblable que les prophages portés par différentes souches lysogènes d'*E. coli* K12 puissent être différents, ne serait-ce que par leur capacité à muter vers le type virulent. Le type sauvage utilisé dans ce travail provient de la souche Y10 sensible à λ virulent, alors que le mutant $\lambda 11$ provient d'un stock de λ ayant pour origine une souche de K12 (λ) résistante à λ virulent (tableau II). On sait que parmi les mutants de K12 (λ) certains deviennent rapidement résistants à λ virulent, d'autres ne le deviennent pas.

donc vraisemblablement de celui-ci par un gène. En croisant ces phages avec le mutant $\lambda 11$, on obtient dans la descendance de 2 à 5.10^{-3} recombinants virulents. Ces résultats peuvent être interprétés par le schéma A de la figure 4 selon lequel le phénotype virulent serait déterminé par deux gènes v_1 et v_2 , v_1 étant vraisemblablement allèle de c^+ .

Les croisements qui viennent d'être décrits peuvent être schématisés de la manière suivante :



La distance $v_1 v_2$ est d'environ 0,5 p. 100. La fréquence de la mutation $v_2^+ \rightarrow v_2$ est environ dix fois plus grande que la fréquence de la mutation $v_1^+ \rightarrow v_1$.

Le schéma A de la figure 4 apparut rapidement incomplet. Parmi les recombinants *grand trouble* obtenus dans le croisement *a*, ce schéma prédit en effet qu'environ 10 p. 100 d'entre eux, de génotype $g_1 v_2 v_1^+$, doivent muter vers la virulence à la fréquence caractéristique de la mutation $v_1^+ \rightarrow v_1$. Parmi 100 recombinants *grand trouble* analysés, aucun ne mutait vers la virulence. Ils ont alors été croisés avec le recombinant complémentaire $g_1^+ v_2^+ v_1$: 9 d'entre eux produisaient, dans la descendance, des recombinants virulents, confirmant leur constitution génétique $g_1 v_2 v_1^+$. Leur incapacité à muter vers la virulence indiquait la présence dans leur génotype d'un troisième gène v_3^+ , dont l'allèle v_3 est nécessaire à l'expression du phénotype virulent (schéma B, fig. 4). Des croisements mettant en œuvre, non pas le type sauvage $\lambda 1$, mais un autre phage $\lambda 1A$ petit et trouble, ont confirmé l'existence du gène v_3 , très lié à v_1 , puisque la fréquence de recombinaison entre v_1 et v_3 est inférieure à 1 p. 1 000, et vraisemblablement situé, par rapport à v_2 , de l'autre côté de v_1 . Enfin, des croisements entre phages virulents et certains mutants de λ , ont permis de révéler l'existence d'un quatrième gène v_4 , situé entre g_1 et v_2 , dont l'absence supprime l'expression du phénotype virulent. Le schéma C de la figure 4 représente les positions relatives des quatre gènes, dont le rôle dans le déterminisme du caractère virulent inducteur vient d'être décrit.

Les mutants virulents du phage λ forment des plages sur K12(λ), avec la même efficacité d'étalement que sur K12S. Cette propriété semble liée à leur pouvoir d'induire le développement du prophage λ . Les bactéries K12(λ) en voie de croissance ont un taux de production spontanée de l'ordre de 10^{-4} . La surinfection de ces bactéries par λ type sauvage n'accroît pas cette probabilité de production spontanée. Après surinfection par le phage virulent $v_1v_2v_3v_4$, cette probabilité s'élève à 1, c'est-à-dire que chaque bactérie devient capable de produire du phage. Après surinfection par un phage porteur du gène v_1 , mais dépourvu de l'un ou de plusieurs des autres gènes de la série v , une bactérie K12(λ) sur 50 environ, au lieu de 1 sur 10 000.

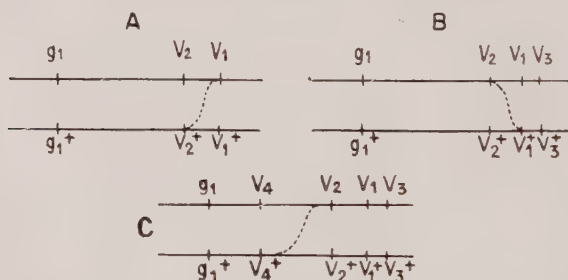


FIG. 4 — Schéma explicatif du croisement : type sauvage \times grand virulent inducteur. Cette représentation purement schématique des loci en jeu ne tient pas compte des liaisons.

produit du phage. Cette propriété confère aux phages porteurs du gène v_1 le pouvoir de former des plages claires sur un mélange d'indicateurs composé de bactéries sensibles K12S et de bactéries immunes K12(λ d), perpétuant un prophage déficient (fig. 1 H). Tous les phages dépourvus du gène v_1 , en particulier les phages clairs, forment des plages troubles sur un tel mélange. On voit donc que si le gène v_1 paraît être allélique de c^+ et de c , il est différent de c et peut être considéré comme constituant un troisième allèle au même locus.

Le rôle des autres gènes v_2 , v_3 et v_4 n'a pas été analysé.

1° POUVOIR LYSOGÉNISANT. — L'analyse génétique du pouvoir lysogénisant, qui définit les phages tempérés, n'a encore fourni que des résultats très partiels. L'allèle c^+ est un élément essentiel du phénotype tempéré, car toute mutation $c^+ \rightarrow c$ s'accompagne de la perte du pouvoir lysogénisant. Toutefois, certains phénotypes troubles possédant le gène c^+ , en particulier ceux qui dérivent du mutant $\lambda 11$ (tableau II), sont incapables de

former des clones lysogènes stables [46]. Dans le croisement entre le type sauvage et le mutant grand clair ($\lambda 27$) :

$$\begin{array}{ccccccc} g_1+c+ & \times & g_1c & \rightarrow & g_1c+ & + & g_1c \\ \text{petit} & & \text{grand} & & \text{grand} & & \text{petit} \\ \text{trouble} & & \text{clair} & & \text{trouble} & & \text{clair} \end{array}$$

les recombinants *grand trouble* g_1c+ ne donnent pas de souches lysogènes stables. Si on recroise les deux recombinants :

$$\begin{array}{ccccccc} g_1c+ & \times & g_1c & \rightarrow & g_1+c+ & + & g_1c \\ \text{grand} & & \text{petit} & & \text{petit} & & \text{grand} \\ \text{trouble} & & \text{clair} & & \text{trouble} & & \text{clair} \end{array}$$

le *petit trouble* ainsi obtenu forme des souches lysogènes et le phage produit ne se distingue pas du type sauvage. A partir du type sauvage, cependant, on peut obtenir des mutants portant le caractère g_1 (ou un allèle de g_1) qui restent capables de lysogéniser. Les phages issus du mutant $\lambda 11$ semblent donc différer du type sauvage par un gène l , proche de g_1 . Un autre gène, situé dans la même région que p_4 (fig. 5), semble jouer lui aussi un rôle dans la lysogénisation. On peut avancer à titre d'hypothèse que le gène $c+$ est indispensable à la fixation du prophage sur son locus spécifique, et que les deux autres gènes, situés à chaque extrémité du groupe de liaison du phage λ sont nécessaires à la stabilisation du complexe ainsi formé. Il est possible que d'autres gènes, dont la présence n'a pas encore été reconnue, jouent également un rôle dans le processus de lysogénisation.

★ ★

Tous les facteurs génétiques reconnus jusqu'ici chez le bactériophage λ paraissent situés sur un *même groupe de liaison*. Ils semblent être disposés selon un ordre linéaire que l'on a tenté

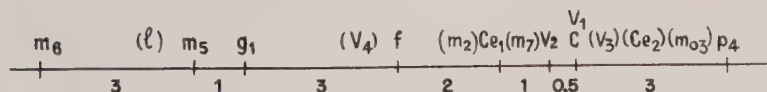


FIG 5. — Schéma indiquant les liaisons observées parmi l'ensemble des caractères analysés chez le bactériophage λ . Les chiffres représentent les fréquences de recombinaison moyenne observées entre deux paires de caractères (somme des deux recombinants/somme des parents et des recombinants) $\times 100$. Les symboles entre parenthèses indiquent les caractères dont la localisation n'a pas été déterminée avec précision.

de représenter sur la figure 5. Les distances indiquées sur cette figure correspondent à la fréquence moyenne de recombi-

naison (exprimée en pour 100) obtenue au cours de divers croisements entre phages différant par *deux* caractères.

A ce sujet, il est important de noter que si l'on croise deux à deux des phages différant par deux caractères choisis parmi trois facteurs disposés dans l'ordre 1, 2, 3, la fréquence de recombinaison entre 1 et 3 est inférieure à la somme des fréquences de recombinaison observée d'une part entre 1 et 2 et d'autre part entre 2 et 3. Ce résultat, déjà obtenu par Doermann et Hill [4] avec le phage T4, semblerait indiquer que les probabilités de recombinaison entre 1 et 2 ou entre 2 et 3 ne sont pas indépendantes. On verra dans le second mémoire de cette série que cette interférence négative n'est qu'apparente et qu'elle est vraisemblablement due au fait que la génétique du bactériophage est en réalité une génétique de population en voie de multiplication.

DISCUSSION.

Les types mutants étudiés chez le bactériophage λ appartiennent à des classes très diverses quant aux propriétés du type sauvage qui s'y trouvent modifiées. Les mutations les plus étudiées chez les bactériophages T2 et T4, celles qui modifient le processus de lyse (caractère r^+) comme celles qui affectent le spectre d'activité (mutants h) ont été recherchées sans succès.

Les mutants apparus spontanément dans les stocks de λ *diffèrent souvent du type parental par plus d'un gène*. Plusieurs facteurs peuvent jouer dans l'apparition de ces mutants polygéniques. Des mutations non exprimées pourraient s'accumuler dans une fraction de la population phagique. C'est ce que l'on observe chez certaines souches de bactéries lysogènes K12 (λ) où les prophages diffèrent par des caractères non exprimés. Il existe également des lignées de phages λ qui présentent une instabilité plus ou moins étendue du système génétique. Si l'on réétale des plages isolées formées par de telles particules, on constate la présence d'un grand nombre de mutants affectant les caractères les plus variés. Après un grand nombre de générations, les clones formés se stabilisent, mais le type finalement obtenu diffère du type originel par plusieurs caractères. Des cas d'instabilité du système génétique ont été décrits chez T2 [22] et T4 [4].

Beaucoup des caractères génotypiques des mutants du bactériophage λ *ne sont pas directement exprimés phénotypiquement*, ce qui complique la caractérisation des mutants et l'analyse génétique des croisements. C'est ainsi que certains caractères affectant la dimension des plages présentent des phénomènes d'*épistasie*. En particulier, le type sauvage possède le caractère g_1^+ épistatique à tous les autres gènes qui affectent la dimension des plages, alors qu'il possède à chacun des autres loci un

allèle qui, en l'absence du gène g_1+ , permettrait l'expression du phénotype *grand*. Tout mutant de taille n'est phénotypiquement exprimé que si le gène g_1+ a préalablement muté vers g_1 . En l'absence de données sur l'effet physiologique de ces différents gènes, il est actuellement difficile d'évaluer l'avantage sélectif qui correspond à la combinaison de toute une série d'allèles *grand* chez un phage ou un prophage qui possède d'autre part un gène g^+ responsable de la formation de petites plages.

D'autres caractères phénotypiques sont *sous la dépendance de deux ou plusieurs gènes*, dont chacun séparément est dénué d'expression phénotypique, ou possède une expression différente. Ceci explique, en particulier, pourquoi certains mutants ne peuvent être qu'exceptionnellement isolés à partir du type sauvage. C'est notamment le cas du phénotype *centré* qui diffère du type sauvage par deux gènes, et du phénotype *virulent inducteur* qui en diffère par quatre.

Tous les caractères analysés chez le bactériophage λ se trouvent situés sur un *même groupe de liaison*. Ceux d'entre eux qui gouvernent la dimension des plages sont distribués tout au long de ce groupe. Il existe par contre une région relativement étroite où se trouvent localisés les différents gènes gouvernant les caractères *trouble*, *clair*, *centré*, *virulent inducteur*, tous caractères qui sont, d'une manière ou d'une autre, en relation avec le processus de lysogénisation. On peut se demander s'il ne s'agit pas d'une spécialisation d'une région du chromosome phagique dont un exemple a récemment été analysé par Benzer [23].

L'existence d'un seul groupe de liaison a été également établi par Murphy dans le cas d'un bactériophage tempéré de *Bacillus megatherium* [8]. Comme dans le cas du bactériophage λ , les fréquences de recombinaison observées par cet auteur pour les facteurs les plus distants étaient relativement faibles, n'excédant pas 10 p. 100. Chez les gros bactériophages virulents, au contraire, les fréquences de recombinaison observées, même entre facteurs liés, sont beaucoup plus élevées. Il sera montré dans un mémoire ultérieur [9] que cette différence relève non pas de la structure du matériel génétique de ces deux classes de phages, mais du nombre de cycles de conjugaison que les particules végétatives subissent avant leur maturation. Il se pourrait que la simplicité relative de l'appareil génétique et du mécanisme de la recombinaison soit un caractère général des bactériophages tempérés.

CONCLUSIONS.

1° Plusieurs mutants du bactériophage λ ont été isolés, qui diffèrent du type sauvage par la dimension ou par l'aspect de

leurs plages, par leur caractère virulent inducteur, ou encore par leur pouvoir de lysogénisation.

2° La recombinaison entre deux phages λ différant par au moins deux caractères peut être réalisée, soit par infection simultanée des bactéries avec les deux types de phages, soit par surinfection avec l'un des types, de bactéries lysogènes perpétuant l'autre type et préalablement induites par le rayonnement U. V. Entre deux caractères donnés, la fréquence de recombinaison est trois à quatre fois plus élevée après surinfection des bactéries lysogènes induites qu'après infection simultanée des bactéries sensibles. Ce résultat semble être dû à l'action du rayonnement U. V.

3° La même fréquence de recombinaison est observée, que les croisements soient réalisés par couplage ou par répulsion. Lorsque les productions de très nombreuses bactéries sont analysées, les recombinants complémentaires apparaissent généralement en proportions analogues.

4° Des particules hétérozygotes pour les deux caractères clair et trouble ou virulent et trouble ont été trouvées qui ségrègent un parent et un recombinant. Leur fréquence est trop faible pour permettre une analyse quantitative.

5° La dimension des plages est déterminée par un grand nombre de loci. Tout se passe comme si à chaque locus existait un allèle déterminant le caractère petit ou moyen et un autre allèle capable de déterminer le caractère grand. En règle générale, tout facteur petit est épistatique aux facteurs moyens et grands et tout facteur grand est hypostatique aux facteurs petits et moyens.

6° Les mutants formant des plages claires diffèrent du type sauvage par un seul gène c . De même, les mutants formant des plages à bord flou diffèrent du type sauvage par un seul gène f . L'aspect centré des plages formées par certains mutants n'est exprimé qu'en présence du gène c^+ . Les phages qui forment des plages centrées diffèrent du type sauvage par deux gènes ce_1 et ce_2 .

7° Les phages possédant le caractère virulent inducteur diffèrent du type sauvage par 4 gènes v_1 , v_2 , v_3 et v_4 dont l'un (v_1) semble être un allèle de c et de c^+ .

8° Pour être capables de lysogéniser les bactéries sensibles, les bactériophages λ doivent posséder l'allèle c^+ . D'autres gènes semblent jouer un rôle dans la stabilité du complexe lysogène.

9° Tous les facteurs génétiques reconnus chez le bactériophage λ paraissent situés sur un même groupe de liaison.

★
★★

Nous remercions M^{lles} M.-R. Hartmann et Y. Nicolas, dont la collaboration nous a été précieuse dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. H. DOERMANN. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 645.
- [2] S. E. LURIA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 463.
- [3] A. D. HERSHEY et R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44.
- [4] A. H. DOERMANN et M. B. HILL. *Genetics*, 1953, **38**, 79.
- [5] A. LWOFF. *Bact. Rev.*, 1953, **17**, 269.
- [6] E. M. LEDERBERG et J. LEDERBERG. *Genetics*, 1953, **38**, 51.
- [7] E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 281.
- [8] J. S. MURPHY. *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 657.
- [9] E. L. WOLLMAN et F. JACOB. *Ces Annales*, 1954, **87**, 674.
- [10] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. En préparation.
- [11] E. M. LEDERBERG. *Genetics*, 1951, **36**, 560.
- [12] J. J. WEIGLE et M. DELBRUCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [13] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 101.
- [14] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **233**, 732.
- [15] J. J. WEIGLE. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1953, **39**, 628.
- [16] E. L. WOLLMAN et F. JACOB. *VI^e Congrès International de Microbiologie*, 1953, **2**, 230.
- [17] F. JACOB, A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 222.
- [18] S. BENZER et F. JACOB. *Ces Annales*, 1953, **84**, 186.
- [19] A. D. HERSHEY et M. CHASE. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 471.
- [20] C. LEVINthal. *Genetics*, 1954, **169**, 184.
- [21] J. LEDERBERG. *Genetics*, 1947, **32**, 505.
- [22] A. D. HERSHEY. *Adv. in Genetics*, 1953, **4**, 89.
- [23] S. BENZER. En préparation.

ÉTUDE GÉNÉTIQUE D'UN BACTÉRIOPHAGE TEMPÉRÉ D'*ESCHERICHIA COLI*.

II. — MÉCANISME DE LA RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE (*)

par E.-L. WOLLMAN et F. JACOB (**.)

(*Service de Physiologie microbienne. Institut Pasteur.*)

INTRODUCTION.

L'analyse génétique d'un certain nombre de caractères du bactériophage λ a fait l'objet d'un premier mémoire [1]. Les renseignements apportés par cette analyse permettent d'aborder l'étude du mécanisme de la recombinaison génétique chez ce bactériophage tempéré.

Les expériences réalisées avec les gros phages virulents T2 [2] et T4 [3] ont conduit à la conclusion que la recombinaison génétique chez ces bactériophages s'effectue entre particules végétatives en voie de multiplication et que, par conséquent, la recombinaison génétique chez les bactériophages est un cas particulier de génétique de populations. Une théorie générale permettant de rendre compte de l'ensemble des résultats obtenus avec T2 et T4 a été formulée par Visconti et Delbrück [4]. Cette théorie peut être résumée de la manière suivante. Les particules parentales, devenues végétatives après pénétration dans les bactéries sensibles, se multiplient et deviennent susceptibles de s'apparier. Ces appariements, au cours desquels peuvent s'échanger des segments génétiques, ont lieu de façon répétée au cours de la phase végétative et s'effectuent au hasard quant au temps et quant au partenaire. Vers le milieu de la période latente, la multiplication est compensée par la maturation qui affecte au hasard les particules végétatives. La maturation est irréversible et toute particule infectieuse formée ne prend plus part à la multiplication. Ainsi est maintenu jusqu'à la lyse un « réservoir » (pool) constant de particules végétatives en voie

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

(**) Manuscrit reçu le 2 septembre 1954.

de multiplication et de conjugaison, tandis qu'augmente régulièrement le nombre de particules mûres, devenues inertes.

Cette théorie repose sur un certain nombre de résultats expérimentaux obtenus avec les phages T2 et T4 : 1° l'augmentation, en fonction du temps, de la proportion des recombinants obtenus [3]; 2° l'existence, parmi les phages libérés par des bactéries infectées avec trois types de phages différant par trois caractères, de particules possédant un caractère de chacun des parents [5]; 3° enfin, dans les croisements mettant en jeu deux phages différant par trois paires d'allèles, un excès de recombinants doubles qui réalise une interférence négative apparente. Si, en effet, les occasions d'appariement sont réparties au hasard parmi les particules végétatives, selon une distribution de Poisson, la population de phages libérée sera hétérogène quant au nombre de conjugaisons subies par chaque particule.

Beaucoup des résultats obtenus avec le bactériophage λ paraissent analogues à ceux déjà observés avec les gros phages virulents T2 et T4. Dans ce mémoire, nous nous proposons de résumer tout d'abord les principaux points qui paraissent communs aux divers systèmes et notamment d'interpréter les résultats obtenus chez λ à la lumière de la théorie de Visconti et Delbrück. Nous insisterons plus longuement sur les aspects de la recombinaison qui paraissent plus particuliers à λ et qui sont peut-être le propre des bactériophages tempérés.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Les caractères du bactériophage λ utilisés pour ce travail, les souches et les techniques de croisement ont été décrits dans un mémoire précédent [4].

Pour les expériences mettant en œuvre des phages différant par trois caractères, nous avons surtout utilisé les caractères m_5 , ce_1 et c . Dans les croisements entre deux phages λ différant par ces trois caractères (et possédant tous deux le gène ce_2), par exemple $m_5ce_1+c \times m_5+ce_1c+$, on peut aisément identifier, par la seule inspection des plages, les deux phénotypes parentaux et quatre phénotypes recombinants (fig. 1) sur six. Ne peuvent être distinguées, d'une part, les plages formées par les deux recombinants m_5+ce_1c et m_5+ce_1+c , et d'autre part, celles formées par le parent m_5ce_1+c et le double recombinant m_5ce_1c .

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1° ASPECT GÉNÉRAL DE LA RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE CHEZ LE BACTÉRIOPHAGE λ . — La recombinaison du bactériophage λ est un processus dynamique qui évolue au cours de la période latente. Cette évolution apparaît clairement lorsqu'on examine, en fonction du temps, la population de bactériophages mûrs

contenus dans les bactéries. Les résultats d'une telle expérience sont présentés sur le tableau I. On voit que des particules de types recombinants sont déjà présentes lors de l'apparition des premiers phages mûrs et que leur proportion augmente régulièrement jusqu'à doubler au moment de la lyse bactérienne.

L'analyse, au cours d'un tel croisement, des productions individuelles de bactériophages par des bactéries isolées, montre que la plupart des bactéries libèrent, outre une majorité de types parentaux, quelques particules de types recombinants (tableau II).

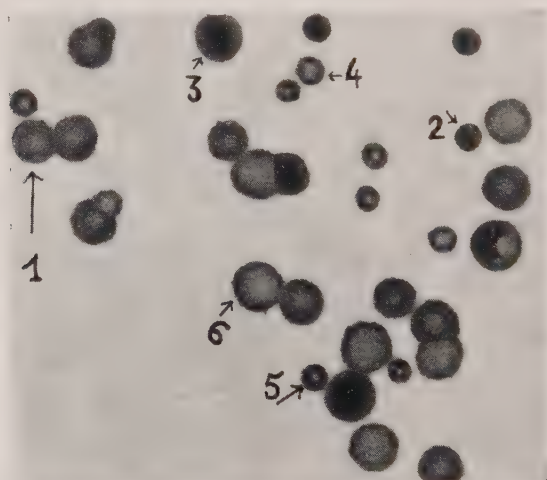


FIG. 1. — Plaques formées sur K12S par la descendance du croisement $m_5 + ce_1 c + \times m_3 ce_1 + c$. 1 = grand centré ($m_5 + ce_1 c +$); 2 = moyen clair (m_5, c); 3 = grand clair ($m_5 +, c$); 4 = moyen trouble ($m_3 ce_1 + c +$); 5 = moyen centré ($m_3 ce_1 c +$); 6 = grand trouble ($m_5 + ce_1 + c +$).

Ce résultat démontre que la faible proportion de recombinants observée dans la totalité de la population de phages libérés est la conséquence de nombreux échanges génétiques survenus tardivement dans la plupart des bactéries et non pas d'échanges rares et précoces survenant chez quelques bactéries.

L'expérience représentée sur le tableau II permet également de constater que, tandis que dans la population totale de phages libérés par la masse des bactéries les types recombinants complémentaires apparaissent en proportions sensiblement égales, dans les productions individuelles cette corrélation n'apparaît pas. La figure 2, qui représente la distribution des types recombinants complémentaires obtenus au cours de plusieurs expé-

TABLEAU I. — Augmentation de la proportion des recombinants en fonction du temps.

KCN ajouté à t =	Nombre moyen de phages mûrs par bactérie	% des recombinants discernables
25 min.	1,7	3,8
30 min.	4,5	5,6
35 min.	13,6	6,4
40 min.	37,7	7,1
45 min.	65	7,5
production finale	131	8,1

Des bactéries sensibles K12S sont infectées en présence de KCN avec des proportions égales de phages m_5+ce_1c+ et m_5ce_1+c . Après vingt minutes d'adsorption à 37°, les bactéries sont lavées, mises en suspension en tampon et diluées dans du sérum anti-phage (temps 0). Après quinze minutes, la suspension est diluée en bouillon. A des temps variables de la période latente, des échantillons sont dilués en bouillon KCN M/200 et, après trente minutes à 37°, dilués et étalés sur gélose. La dernière colonne représente la proportion totale (%) des recombinants $m_5+.c$, m_5ce_1c+ , m_5ce_1+c et m_5+ce_1+c que l'on peut reconnaître.

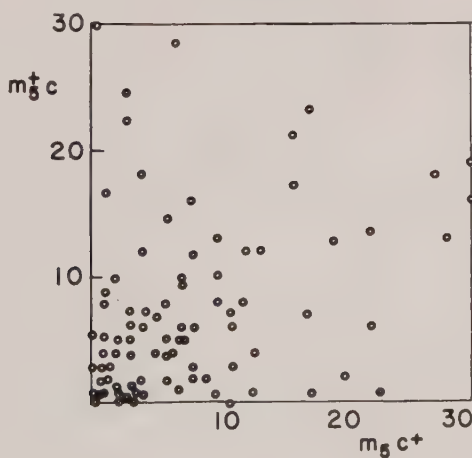


FIG. 2. — Diagramme de corrélation entre recombinants complémentaires. Distribution, parmi les productions individuelles, des recombinants complémentaires $m_5+.c$ et $m_5.c+$ au cours de croisements mettant en œuvre des multiplicités égales de phages m_5+ce_1c+ et m_5ce_1+c .

TABLEAU II. — Productions individuelles de bactéries infectées avec des proportions égales de phages m_5+ce_1c+ et m_5ce_1+c .

Nombre total de tubes						189
Nombre de tubes contenant du phage						46
Nombre de tubes estimés contenir plus d'une bactérie productrice, d'après la distribution de Poisson						<7
Tubes n°	$m_5.c$	m_5+ce_1c+	$m_5.c$	m_5ce_1c+	m_5ce_1+c	m_5+ce_1+c
1	57	74	2	4	-	-
2	-	97	-	-	-	-
3	73	83	8	8	2	1
4	32	29	12	3	1	-
5	76	81	5	4	2	2
6	31	45	3	1	-	-
7	83	-	-	-	-	-
8	13	29	1	2	-	-
9	63	28	8	4	2	1
10	53	32	1	-	-	-
11	37	46	-	-	-	-
12	63	52	4	1	-	-
13	65	11	2	6	3	1
14	29	37	1	2	-	-
15	43	29	3	-	-	-
16	83	-	25	-	2	2
17	16	33	7	4	-	-
18	81	31	4	1	-	-
19	62	5	-	1	-	-
20	81	-	-	-	-	-
21	37	49	-	-	-	-
22	23	13	2	1	-	-
23	57	74	16	23	2	1
24	55	38	5	2	1	-
25	47	65	5	6	1	-
26	63	51	4	2	1	-
27	114	73	1	2	-	-
28	149	201	7	3	2	1
29	19	58	3	8	3	2
30	29	14	1	4	-	-
31	12	89	2	5	3	1
32	37	53	5	7	-	-
33	129	87	2	16	4	3
34	36	24	1	-	-	-
35	89	61	1	2	-	-
36	34	11	7	9	2	-
37	17	19	1	2	-	-
38	69	8	-	1	-	-
39	283	202	10	13	-	-
40	39	6	19	24	1	-
41	162	189	5	7	1	-
42	29	38	21	16	1	-
43	108	49	3	1	4	-
44	47	5	1	-	3	-
45	65	42	2	5	1	-
46	27	1	11	-	-	-
Total	2817	2262	217	200	42	15

Des bactéries sensibles sont infectées avec des proportions égales de phages en présence de KCN. Après vingt minutes d'adsorption à 37°, la suspension est diluée dans du sérum spécifique anti-phage. Après vingt-minutes, la suspension est diluée en bouillon et distribuée en tubes, de manière à obtenir environ une bactérie pour 3 à 4 tubes. A la centième minute, le contenu de chaque tube, préadsorbé sur des bactéries indicatrices, est étalé sur gélose.

riences de productions individuelles, exprime cette absence de corrélation.

Enfin, au cours des croisements entre deux phages différant par trois caractères (tableau III), on constate que la proportion

TABLEAU III. — Croisements entre deux phages différant par trois caractères.

Croisement	abc	ABC	A.o	aBC	abc	ABC	r _{AB}	r _{BC}	r _{aBc}	(r _{AB} + r _{aBc}) (r _{BC} + r _{aBc})	m
m ₅ ce ₁ c x m ₅ ce ₁ c ⁺	m ₅ .o 3875	m ₅ ce ₁ c ⁺ 3121	m ₅ .o ⁺ 306	m ₅ ce ₁ c ⁺ 280	m ₅ ce ₁ c ⁺ 61	m ₅ ce ₁ c ⁺ 20	0,073	0,016	0,0052	0,0016	0,64
"	4139	3796	466	379	74	31	0,086	0,017	0,007	0,0022	0,72
"	7414	8163	918	775	162	63	0,088	0,0185	0,007	0,0024	0,7
"	4671	3987	381	344	62	33	0,072	0,013	0,0078	0,0016	0,45
m ₅ c ⁺ p ₄ x m ₅ cp ₄ ⁺	m ₅ c ⁺ p ₄ 2675	m ₅ cp ₄ ⁺ 2945	-	m ₅ cp ₄ ⁺ 302	m ₅ c ⁺ p ₄ ⁺ 70	m ₅ c ⁺ p ₄ ⁺ 34	0,097	0,023	0,011	0,0037	0,68

Croisements réalisés par infection de bactéries sensibles avec des proportions égales de deux types de phages différant par trois caractères. Les valeurs r sont obtenues en doublant la proportion d'un des deux recombinants correspondant à chaque classe. Les valeurs m sont calculées d'après l'équation (7) du texte.

des recombinants doubles est toujours supérieure à celle que permettraient de calculer les fréquences des recombinants simples dans le cas d'un arrangement linéaire où les recombinaisons au niveau des deux régions considérées seraient statistiquement indépendantes.

L'ensemble de ces résultats est analogue à ce qui a déjà été observé avec les phages T2 et T4. Il paraît donc justifié de rechercher dans quelle mesure la théorie de Visconti et Delbrück peut être appliquée à la recombinaison du bactériophage λ .

2° LES CYCLES DE CONJUGAISON. — La théorie de Visconti et Delbrück utilise deux paramètres, à savoir le nombre moyen m de cycles de conjugaison que chaque particule libérée a subi au cours de la multiplication végétative, et la probabilité de recombinaison p entre deux caractères donnés. La fréquence r_{ab} de recombinaison observée entre deux caractères a et b (somme des deux recombinants/somme des deux parents et des deux recombinants) est liée à ces deux paramètres par la formule :

$$r_{ab} = \frac{1 - e^{-mp_{ab}}}{2} \quad (1)$$

Chez le bactériophage T2 où il existe plusieurs groupes de liaison, la probabilité p_{ab} de recombinaison entre deux caractères non liés est considérée comme étant de 0,5. A partir des valeurs expérimentales de r_{ab} , il est ainsi possible de calculer m que Visconti et Delbrück ont estimé être voisin de 5.

Lorsque les caractères sont situés sur un même groupe de liaison, comme dans le cas de λ , les deux valeurs p et m sont inconnues. On peut cependant estimer la valeur de m si l'on admet, d'une part, que la recombinaison se fait sans interférence, hypothèse qui paraît vérifiée dans le cas de T2 [4] et de T4 [3], et, d'autre part, que la principale cause d'hétérogénéité entraînant un excès de recombinants doubles est bien la distribution au hasard des occasions de conjugaison parmi les particules. S'il n'y a pas d'interférence, les probabilités de recombinaison deux à deux entre trois caractères liés et disposés dans l'ordre 1, 2, 3 sont unies par la relation générale [6] :

$$P_{13} = P_{12} + P_{23} - 2 P_{12} \cdot P_{23} \quad (2)$$

qui devient, lorsqu'on multiplie par m tous les termes de l'équation [2] :

$$mp_{13} = mp_{12} + mp_{23} - \frac{1}{m} 2 mp_{12} \cdot mp_{23} \quad (3)$$

d'où :

$$m = \frac{2 mp_{12} \cdot mp_{23}}{mp_{12} + mp_{23} - mp_{13}} \quad (4)$$

Les trois valeurs mp_{12} , mp_{23} et mp_{13} peuvent être calculées à partir des valeurs expérimentales r_{12} , r_{23} et r_{13} grâce à la formule [1]. Dans le tableau IV sont représentées les valeurs r expérimentales et les valeurs m calculées au cours de plusieurs expériences. On voit que le nombre moyen de conjugaisons par particule peut être estimé compris entre 0,5 et 0,8.

TABLEAU IV. — Fréquences de recombinaison observées dans des séries de trois caractères.

Séries de caractères			Fréquences de recombinaison			m
1	2	3	r_{12}	r_{23}	r_{13}	
g_1	oe_1	c	0,052	0,017	0,061	0,54
"	"	"	0,062	0,019	0,073	0,68
m_6	g_1	c	0,04	0,065	0,082	0,74
"	"	"	0,035	0,058	0,073	0,54
m_5	c	p_4	0,091	0,031	0,102	0,75
m_6	c	p_4	0,118	0,038	0,127	0,72
g_1	c	p_4	0,074	0,038	0,096	0,84
m_5	g_1	c	0,024	0,075	0,081	0,46

Pour chaque série de trois caractères disposés dans l'ordre 1, 2, 3, les fréquences de recombinaison r_{12} , r_{23} et r_{13} sont déterminées à partir de trois croisements, effectués au cours de la même expérience, entre des phages différant deux à deux par deux de ces caractères. Les valeurs r sont obtenues en additionnant les proportions des deux recombinants complémentaires lorsque ceux-ci peuvent tous deux être distingués, ou en doublant la proportion d'un recombinant lorsqu'un seul des deux recombinants peut être distingué. Les valeurs m sont calculées d'après l'équation (4) du texte.

Les mêmes hypothèses permettent de calculer m à partir de l'excès de recombinants doubles observés dans les croisements entre phages différant par trois caractères. Désignons ces phages par abc et ABC . Soit r_{aB} la proportion trouvée des deux recombinants complémentaires entre les caractères a et B ($aB + Ab$), r_{bC} celle entre b et C et r_{aBc} celle des recombinants doubles. Si le produit mp est petit, on peut simplifier la formule [1] et écrire :

$$m_{12} = 2 r_{12} \quad (6)$$

Dans le croisement entre phages différant par trois caractères abc et ABC , on peut écrire que :

$$\begin{aligned} mp_{12} &= 2 (r_{aB} + r_{aBc}) \\ mp_{23} &= 2 (r_{bC} + r_{aBc}) \\ mp_{13} &= 4 r_{aBc}. \end{aligned}$$

En substituant ces valeurs dans la formule [4], on obtient :

$$m = 2 \frac{(r_{aB} + r_{aBc})(r_{bC} + r_{aBc})}{r_{aBc}}. \quad (7)$$

Les valeurs expérimentales trouvées dans les croisements entre phages différant par trois caractères offrent donc la possibilité d'estimer m . Sur le tableau III où sont représentés les résultats expérimentaux et les valeurs de m trouvées au cours de plusieurs expériences, on voit que, comme précédemment, les valeurs de m paraissent voisines de 0,5-0,8.

Il faut insister sur le fait que l'estimation du nombre moyen de conjugaisons par particule de phage libéré n'est valable que si l'on admet qu'il n'y a pas d'interférence. On peut cependant ajouter que les valeurs ainsi trouvées sont compatibles avec la valeur limite imposée par la plus grande fréquence observée entre les deux caractères connus les plus éloignés l'un de l'autre. En admettant, en effet, que la distance entre les deux caractères m_6 et p_4 est suffisamment grande pour qu'ils se comportent comme deux caractères non liés ($p = 0,5$), on peut, à partir de la valeur expérimentale $r_{m_6p_4} = 0,13$, calculer une valeur limite de m en utilisant la formule [1] :

$$0,13 = \frac{1 - e^{-m \cdot 0,5}}{2}$$

ce qui donne $m' = 0,6$.

En conclusion, les résultats obtenus par l'étude génétique du bactériophage λ semblent compatibles avec la théorie de Visconti et Delbrück. Le nombre moyen de conjugaisons par particule de phage serait, selon cette théorie, dix fois plus petit chez λ que chez T2, alors que le nombre de replications des particules végétatives est sensiblement du même ordre de grandeur dans les deux systèmes.

Il faut noter que ce petit nombre de cycles de conjugaison semble pouvoir expliquer les fluctuations de la fréquence de recombinaison entre deux caractères donnés observés d'une expérience à l'autre. L'examen de la formule [1] montre, en effet, que pour une valeur donnée de p , de petites modifications de m sont insuffisantes pour changer notablement les valeurs de r , lorsque m est relativement élevé comme chez T2. Si, au contraire, m est petit comme chez λ , des changements de m peuvent modifier

sensiblement la valeur de r . Les expériences rapportées sur les tableaux III et IV montrent que les valeurs calculées de m sont d'autant plus élevées que les fréquences de recombinaison r trouvées expérimentalement sont plus grandes. Il se pourrait que le nombre moyen des cycles de conjugaison puisse, d'une expérience à l'autre, subir des fluctuations suivant l'état des bactéries, la composition du milieu de culture, etc.

3° L'ÉVÈNEMENT-RECOMBINAISON. — Lorsque des bactéries sont infectées avec des proportions très inégales de deux types de phage, toute recombinaison du parent minoritaire P_m a les plus grandes chances de s'effectuer avec le parent majoritaire P_M . De même, les recombinants R ainsi formés s'apparieront le plus fréquemment avec P_M , ce qui ne modifiera pas qualitativement la constitution génétique de la population. Lorsque le nombre moyen des conjugaisons subies par chaque particule de phage est élevé, comme dans le cas de T2 de de T4, la population de phages libérée par la lyse bactérienne est le résultat d'un nombre considérable d'événements-recombinaisons. Lorsque le nombre moyen des conjugaisons est faible, on contraire, on peut espérer que dans certains cas exceptionnels, le nombre des événements qui aura affecté la population végétative pourra être suffisamment petit et pourra survenir suffisamment tôt au cours de la multiplication pour que l'on puisse obtenir des renseignements sur le mécanisme qui préside à la recombinaison entre deux particules végétatives.

Pour l'interprétation de telles expériences, il est nécessaire de connaître tout d'abord le nombre des particules qui, dans une bactérie, peuvent prendre part à la multiplication du phage, lorsque l'infection est réalisée avec un grand nombre de particules. Ce type d'expériences et de calculs a déjà été réalisé avec le bactériophage T2 par Dulbecco [7] qui a montré que la participation des particules infectantes à la multiplication était limitée et ne dépassait pas 8 à 10 en moyenne par bactérie. Cette valeur paraît être une limite inférieure car dans les expériences de Dulbecco, les bactéries étaient infectées en milieu nutritif ce qui n'empêchait pas l'effet d'exclusion par surinfection [8].

Le principe de ces expériences consiste à infecter des bactéries avec des proportions variables de deux bactériophages génétiquement marqués et à rechercher la fraction des productions individuelles qui ne contiennent que le parent majoritaire. Si le nombre moyen des particules de chaque type est suffisamment élevé pour que chaque bactérie ait adsorbé plus de 4 particules de chaque type, la seule restriction apportée à la production simultanée des deux types par chaque bactérie sera due à la participation limitée des particules à la multiplication du phage. Le bactériophage λ est un matériel parti-

culièrement favorable pour la réalisation de telles expériences, car les bactéries en fin de croissance exponentielle peuvent être infectées par 80 ou 100 particules sans qu'on observe de lyse du dehors.

Nous avons utilisé un mode de calcul dû à A. Novick, un peu différent de celui employé par Dulbecco. Soient n la multiplicité d'infection de l'un des phages a , m celle de l'autre phage b , N la somme $n + m$ et K le nombre des particules prenant part à la multiplication. Désignons par r le rapport n/N et par $1 - r$ le rapport m/N . La fraction F des bactéries ayant adsorbé K phages ou plus est :

$$F = 1 - \sum_{x=0}^{x=K-1} \frac{N^x}{x!} e^{-N}. \quad (8)$$

Dans cette fraction, la probabilité pour que toutes les particules prenant part à la multiplication chez une bactérie soient du type a est r^K et pour qu'ils soient tous du type b est $(1-r)^K$. La fraction des bactéries produisant un seul type de phage du fait de la participation limitée des particules sera :

$$P_o \lim = \left[1 - \sum_{x=0}^{x=K-1} \frac{N^x}{x!} e^{-N} \right] \left[r^K + (1-r)^K \right] \quad (9)$$

Si $N \gg K$, on peut admettre que $\sum_{x=0}^{x=K-1} \frac{N^x}{x!} e^{-N} = 0$. D'où

$$P_o \lim = r^K + (1-r)^K \quad (10)$$

qui pour les petites valeurs de r devient :

$$P_o \lim = (1-r)^K. \quad (11)$$

Sur le tableau V sont représentés les résultats de plusieurs expériences au cours desquelles les bactéries ont été infectées, en présence de KCN, avec des proportions variables de deux bactériophages et les productions individuelles analysées. On voit que le nombre moyen des particules prenant part à la multiplication du phage est relativement faible et peut être estimé être voisin de 6 à 7 par bactérie.

Une fois ce résultat connu, on peut tenter d'analyser la distribution des recombinants dans les productions individuelles de bactéries infectées avec des proportions très inégales de deux types de phages. Les résultats d'une telle expérience sont rapportés sur le tableau VI, où sont exclusivement considérées les bactéries ayant libéré des particules issues des deux parents. Ce qui frappe, dès l'examen du tableau VI, c'est l'extrême hétérogénéité de ces productions individuelles qui ont été arbitrairement réparties en 4 classes. La classe A comprend les bactéries qui

libèrent les deux types parentaux, mais pas de recombinants. Dans la classe B, qui comprend la majorité des cas, les bactéries libèrent les deux types parentaux et des types recombinants en proportions variables, mais inférieures à celle du parent minoritaire. Deux de ces bactéries n'ont libéré qu'un seul des deux recombinants complémentaires les plus fréquents. Dans la classe C, le parent minoritaire apparaît en proportions inférieures à celle d'un au moins des recombinants et, le plus souvent, des deux. Enfin, la classe D comprend les bactéries qui libèrent exclusivement le parent majoritaire et un recombinant.

TABLEAU V. — Nombre moyen de particules prenant part dans une bactérie à la multiplication du bactériophage λ .

Exp. n°	n	m	$r = \frac{n}{m+n}$	$1+r$	Nombre total de tubes	Nombre de tubes con- tenant du phage	Nombre de tubes con- tenant un seul type	P_0	K
1	13	19	0,44	0,56	188	47	3	0,044	< 5
2	9,3	16,8	0,37	0,63	201	49	4	0,082	> 5
3	13	38	0,25	0,75	223	64	7	0,109	< 8
4	6	53,5	0,10	0,90	239	18	32	0,56	> 5
5	6,6	49,5	0,12	0,88	207	52	21	0,41	< 7

Résultats d'expériences de productions individuelles par des bactéries infectées avec des proportions variables de phages $m_5 + ce_5c +$ et $m_5ce_1 + c$. Les valeurs K sont calculées d'après la formule (10) du texte.

Sur un total de 4 expériences de ce type, les productions individuelles de 143 bactéries libérant des particules issues des deux types parentaux ont été analysées. Parmi ces bactéries, 6 p. 100 correspondaient à la classe A, 81 p. 100 à la classe B, 11 p. 100 à la classe C et 2 p. 100 à la classe D. Une autre expérience réalisée dans les mêmes conditions a toutefois donné des résultats très différents, les productions individuelles de la classe C représentant plus de 80 p. 100 des productions mixtes.

Ces expériences confirment l'absence déjà observée de corrélation entre recombinants complémentaires. Elles permettent, en outre, d'étudier la variation d'une expression, peut-être significative, de l'événement-recombinaison, le rapport d indiquant comment un caractère apporté par le parent minoritaire est distribué entre celui-ci et les recombinants. Dans les deux dernières colonnes du tableau VI, sont rapportées, pour chaque production individuelle, les valeurs des rapports $d_1 = m_5^+$ (P_m/R) et $d_2 = c^+$ (P_m/R). La variabilité de d_1 et d_2 peut ressortir de mécanismes divers. Elle pourrait, en particulier, refléter les erreurs d'échantillonnage que représente la maturation au hasard des particules

TABLEAU VI — Productions individuelles de bactéries infectées avec des proportions inégales de phages.

Nombre moyen de phages $m_5^+ce_1c^+$ adsorbés/bactérie	6,5
" " " " $m_5ce_1c^+$ " "	49,5
Nombre total de tubes	207
Nombre de tubes ne contenant pas de phage	155
" " " contenant $m_5ce_1c^+$ seul	21
" " " " une population mixte	31
" " " estimés contenir plus d'une bactérie productrice, d'après la distribution de Poisson	48

Tubes contenant des populations mixtes								
Classe	$m_5.c$	$m_5^+ce_1c^+$	$m_5^+.c$	$m_5ce_1c^+$	$m_5ce_1c^+$	$m_5^+ce_1c^+$	$m_5(\frac{P_M}{M})$	$c^+(\frac{P_M}{M})$
	ab^+o P_M	a^+bo^+ P_M	$a^+.o$	abo^+	ab^+o^+	$a^+b^+o^+$	d_1	d_2
A	293 147	61 32	- -	- -	- -	- -		
B	43 96 39 47 153 61 400 67 59 293 94 101 83 42 61 350 49 65 103 229 87 103 63	12 23 11 13 31 14 48 26 46 14 51 21 61 57 24 46 24 39 16 46 5 12	4 3 2 1 5 3 7 1 6 6 4 10 5 1 4 2 4 3 3 5 5 -	6 1 5 4 7 5 9 - 4 2 3 7 6 9 16 1 2 6 10 3 2 3 4	- 1 - 1 - 2 - - 5 - 1 - 1 4 1 - - - 5 1 -	- - 1 - 2 1 - - 3 - - - - 2 2 1 - - - - - -	3 7,6 3,7 13 4,4 3,5 7 26 4,2 2,3 8,5 5,2 6 9,5 8 9 8 9,7 2,6 5,7 1,6 6	2 11,5 1,1 2,6 3,4 1,7 5,3 - 3,6 7 12,7 3 9,5 6,3 1,1 15,3 4,8 6,5 0,9 9,2 4 1,6 3
C	112 32 63 69	- 7 3 2	11 4 11 8	12 14 17 -	- 2 2 -	- - 1 -	0 1,8 0,2 0,2	0 0,4 0,1
D	57 73	- -	27 21	- -	- -	- -		

Production en masse par 10^5 bactéries					
7650	925	202	188	37	19

Des bactéries sensibles sont infectées avec des proportions inégales de phages $m_5^+ce_1c^+$ et $m_5ce_1c^+$. Après adsorption, les phages libres sont neutralisés par du sérum spécifique anti-phage. La suspension est alors diluée et distribuée en tubes de manière à obtenir une bactérie pour 3 ou 4 tubes.

végétatives. Cependant, les productions individuelles de la classe C et surtout de la classe D peuvent difficilement être interprétées

de cette manière, à moins d'admettre que le « réservoir » de particules végétatives ne soit très petit.

Il est possible également que les valeurs de d_1 et d_2 puissent, du moins dans les cas extrêmes, exprimer le moment du *premier* événement-recombinaison affectant, dans une bactérie, une particule P_m au cours de la multiplication. Il est bien évident, en effet, que chez les bactéries infectées avec des proportions très inégales de types parentaux, on observera des clones de recombinants d'autant plus importants que la première conjugaison d'une particule minoritaire sera survenue plus tôt. Il entre malheureusement dans l'évaluation d'une telle hypothèse un certain nombre de paramètres sur lesquels on ne possède encore actuellement que des données insuffisantes, notamment l'importance du « réservoir » de particules végétatives et la variation de la probabilité de conjugaison par particule végétative au cours de la multiplication jusqu'à l'établissement du « réservoir ». Quoique cette hypothèse ne soit pas encore susceptible de vérification expérimentale, elle permettrait le mieux à notre sens, de rendre compte des productions individuelles de la classe D où existent des clones de recombinants et d'où le type parental minoritaire a disparu.

DISCUSSION.

La théorie générale formulée par Visconti et Delbrück à partir des résultats obtenus avec les pages T2 et T4 permet également de rendre compte, dans leurs grandes lignes, des faits observés dans l'étude du phage λ . La principale différence entre les deux systèmes réside dans la constatation que le nombre de cycles de conjugaison trouvé chez λ (0,5 à 0,8) est plus petit que chez T2 (5 à 7). Il est possible que ce soit là une propriété des bactériophages tempérés car les résultats rapportés par Murphy [9] chez *B. megatherium* indiquent qu'il n'y a pas plus de 0,5 cycles de conjugaison en moyenne.

L'existence de particules diploïdes hétérozygotes, démontrée par Hershey et Chase [5], ne trouve pas d'interprétation satisfaisante dans le schéma de Visconti et Delbrück. Etudiant la structure de ces hétérozygotes, Levinthal [10] a constaté que, dans les croisements entre deux phages T2 différant par trois caractères ABC, les hétérozygotes pour le caractère médian B étaient recombinants pour les deux caractères extrêmes A et C. Cette observation a conduit Levinthal à proposer, pour la recombinaison du bactériophage T2, un nouveau schéma qui implique deux hypothèses principales. D'une part, les processus de multiplication et de recombinaison ne seraient pas indépendants, la recombinaison s'effectuant entre particules en voie de replication. D'autre part, les hétérozygotes constitueraient la source

de l'ensemble des recombinants formés au cours d'un croisement. Dans le modèle suggéré par Levinthal, deux particules végétatives en cours de replication s'apparient, les deux répliques partiellement formées se réunissant pour constituer un hétérozygote qui ségrégera un type parental et un type recombinant. Un tel schéma implique donc le maintien en tant que telles des deux particules parentales et la formation d'un seul recombinant.

L'étude de la recombinaison chez les bactériophages est, au premier chef, un problème de génétique de population. Le processus élémentaire de recombinaison entre deux particules est de ce fait obscurci et difficile à saisir. Le schéma proposé par Levinthal et les résultats obtenus avec le bactériophage λ conduisent cependant à poser le problème, ne serait-ce qu'en termes très généraux. Lorsqu'il y a recombinaison entre deux particules végétatives, y a-t-il conservation ou disparition des deux types parentaux ? La recombinaison a-t-elle pour conséquence la formation de deux types recombinants complémentaires ou d'un seul recombinant ? *En d'autres termes, le produit d'un événement-recombinaison est-il constitué par quatre particules (deux parents et deux recombinants), par trois (deux parents et un recombinant), par deux (deux recombinants ou un parent et un recombinant), ou enfin par une seule (un recombinant).*

Tout schéma associant étroitement replication et recombinaison apparaît difficilement compatible avec les résultats obtenus chez λ . Le nombre de générations qui peuvent s'effectuer entre l'infection et la lyse est, en effet, supérieur à 5 alors que le nombre moyen de conjugaisons est inférieur à 1. La conjugaison pourrait cependant n'avoir lieu qu'entre particules en voie de replication comme le veut le schéma de Levinthal.

L'hypothèse selon laquelle les particules parentales survivraient à la conjugaison est peu compatible avec les petites valeurs du rapport « type parental minoritaire/types recombinants » observées dans les productions individuelles de λ . Visconti et Delbrück [4] ont déjà constaté que, dans les croisements de T2 à multiplicités inégales, on obtient plus de recombinants que de parents minoritaires dans la production totale. Cette observation n'exclut pas la survie du parent minoritaire lors de la conjugaison, car le grand nombre de cycles de conjugaison existant chez T2 rend l'analyse difficile. Au contraire, lorsque le nombre de cycles de conjugaison est petit, comme chez λ , la disparition du parent minoritaire observée dans certaines productions individuelles ne semble pas compatible avec l'hypothèse de la survie des particules parentales.

La formation des deux recombinants complémentaires au cours de la conjugaison est implicitement contenue dans la théorie de Visconti et Delbrück dont elle ne constitue d'ailleurs

pas un élément essentiel. Cette hypothèse rend imparfaitement compte du manque de corrélation entre recombinants complémentaires, observé notamment chez λ où le nombre moyen des conjugaisons est petit et n'offre pas d'explication satisfaisante aux productions individuelles de λ qui comprennent le type parental majoritaire et un seul type recombinant.

L'hypothèse selon laquelle la conjugaison aboutirait à la formation d'un *type parental* et d'un *type recombinant* retient l'essentiel du schéma de Levinthal qui fait des hétérozygotes la source de tous les recombinants. Cependant, elle s'accorde mal avec l'existence, dans les expériences à multiplicités d'infection inégales, de productions individuelles où les *deux* types recombinants complémentaires se trouvent en large excès par rapport au type parental minoritaire.

La dernière hypothèse évoquant la formation d'un *seul recombinant* par événement-recombinaison pourrait être assimilée à un transfert unidirectionnel de matériel génétique tel qu'on l'observe chez les bactéries. Une telle hypothèse, qui paraît compatible avec l'ensemble des résultats expérimentaux, rendrait compte de l'absence de corrélation entre recombinants complémentaires observée dans tous les systèmes et surtout des cas atypiques observés chez λ dans les productions individuelles.

Il est bien évident que l'ignorance où nous nous trouvons encore de certaines données essentielles, telles que la dimension du « réservoir » et la distribution des conjugaisons et des maturations dans le temps, ne permet pas de choisir entre ces diverses hypothèses. Des conjugaisons précoces suivies de maturation également précoce d'un des produits de la conjugaison permettraient en effet, au cas où le « réservoir » serait petit, d'expliquer l'une quelconque des distributions observées dans les productions individuelles. Il nous a semblé cependant que le problème méritait d'être discuté car l'étude de bactériophages tels que λ , chez lesquels le nombre de cycles de conjugaison est petit devrait permettre d'obtenir des indications sur l'événement-recombinaison lui-même.

CONCLUSIONS.

1° Lors des croisements entre deux bactériophages λ , différant par deux caractères ou plus, la fréquence de recombinaison, entre ces caractères, évolue de façon dynamique au cours de la période latente. Elle est environ deux fois plus élevée au moment de la lyse qu'au moment de l'apparition des premières particules infectieuses.

2° Dans les productions individuelles de phages par des bactéries isolées, il n'y a pas ou peu de corrélation entre recombinants complémentaires.

3° Dans les croisements entre deux phages différant par trois caractères, la proportion des recombinants doubles est supérieure à ce que laisseraient prévoir les proportions des recombinants simples. De même, si l'on croise deux à deux des phages différant par deux caractères choisis entre trois facteurs disposés dans l'ordre 1, 2, 3, la fréquence de recombinaison observée entre 1 et 3 est inférieure à la somme des fréquences observées entre 1 et 2 et entre 2 et 3.

4° L'ensemble de ces résultats indique que la théorie générale formulée par Visconti et Delbrück semble applicable à la recombinaison génétique chez le bactériophage λ . Le nombre des conjuguaisons subies en moyenne par les particules de la descendance serait alors compris entre 0,5 et 0,8.

5° Le nombre de particules prenant part à la multiplication du bactériophage λ est faible, de 5 à 7 en moyenne par bactérie.

6° Parmi les bactéries infectées avec des proportions inégales de deux phages différant par deux caractères ou plus, la plupart des bactéries libèrent le parent minoritaire en proportion supérieure à celle des recombinants. Dans certains cas, cependant, le parent minoritaire apparaît en proportion inférieure à celle des recombinants ou même disparaît alors que les deux recombinants sont présents. Exceptionnellement, une bactérie peut libérer le parent majoritaire et un seul recombinant.

*
* *

Nous tenons à remercier MM. M. Delbrück, A. Novick et N. Symonds pour leurs suggestions et leurs critiques, ainsi que pour l'aide apportée à la partie mathématique de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1954, **87**, 653.
- [2] A. D. HERSHEY et R. ROTMAN. *Genetics*, 1949, **34**, 44.
- [3] A. H. DOERMAN et M. B. HILL. *Genetics*, 1953, **38**, 79.
- [4] N. VISCONTI et M. DELBRÜCK. *Genetics*, 1953, **38**, 5.
- [5] A. D. HERSHEY et M. CHASE. *old Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 471.
- [6] J. B. S. HALDANE. *J. Genet.*, 1919, **8**, 299.
- [7] R. DULBECCO. *Genetics*, 1949, **34**, 126.
- [8] S. M. LESLEY, R. C. FRENCH, A. F. GRAHAM et C. E. VAN ROOYEN. *Can. J. med. Sci.*, 1951, **29**, 128.
- [9] J. S. MURPHY. *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 657.
- [10] C. LEVINthal. *Genetics*, 1954, **169**, 184.

L'étude génétique du bactériophage λ a été réalisée indépendamment par M. D. Kaiser (Thèse de Ph. D. California Institute of Technology, 1954), qui a abouti à des conclusions très comparables aux nôtres.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES TUMEURS DU CROWN-GALL CHEZ *PELARGONIUM ZONALE*

III. — EMPLOI DE RADIOISOTOPES

par P. MANIGAULT (*).

(*Institut Pasteur.*)

Nous avons précédemment abordé (Manigault, 1953) l'étude du métabolisme du phosphore dans les tissus tumoraux de la plante et dans les tissus sains connexes, et nous avons indiqué combien le rôle des phosphatases apparaît important, dès les premiers stades de la tumorigénèse.

Nous voudrions préciser ces faits en rapportant des expériences très simples que l'on peut réaliser en employant le radiophosphore ^{32}P à l'état de phosphate monosodique, le radiosoufre ^{35}S sous forme de sulfate neutre de sodium et le radiostrontium ^{90}Sr en solution nitrique. Des expériences préliminaires ont permis de déterminer les concentrations en radio-isotopes qui étaient assez faibles pour que les radiations émises ne perturbent pas les phénomènes biologiques étudiés. Les solutions radioactives diluées montent dans la plante en pénétrant, dans quelques cas, par les racines, mais le plus souvent par aspiration dans la tige fraîchement coupée et trempée dans le liquide au moment de l'expérience. La radioactivité initiale du liquide est contrôlée par une mesure au compteur de G. M. et l'absorption du liquide est complète quelques heures plus tard au moment où la plante est sacrifiée. Les coupes au microtome à congélation sont fixées au Carnoy, posées sur lame et recouvertes d'un vernis en couche très mince qui protège l'émulsion photographique de toute injure chimique.

Nous avons utilisé une émulsion pour radiographie dentaire (Kodak, périapical) et une émulsion pelliculable (Kodak Scientific plates autoradiographic). Après un temps de pose convenable — cinq à vingt jours — on développe au promicrol et on colore la coupe ou une coupe témoin au vert de méthyle-pyronine. Nous avons employé des plantes de deux espèces : *Pelargonium zonale* L., variété Jardin des Plantes, et *Datura stramonium* L., et nous avons inoculé nos sujets par paires en gardant l'un des deux pour nous assurer de l'évolution de la piqûre après l'inoculation. Celle-ci a été faite avec deux souches d'*Agrobac-*

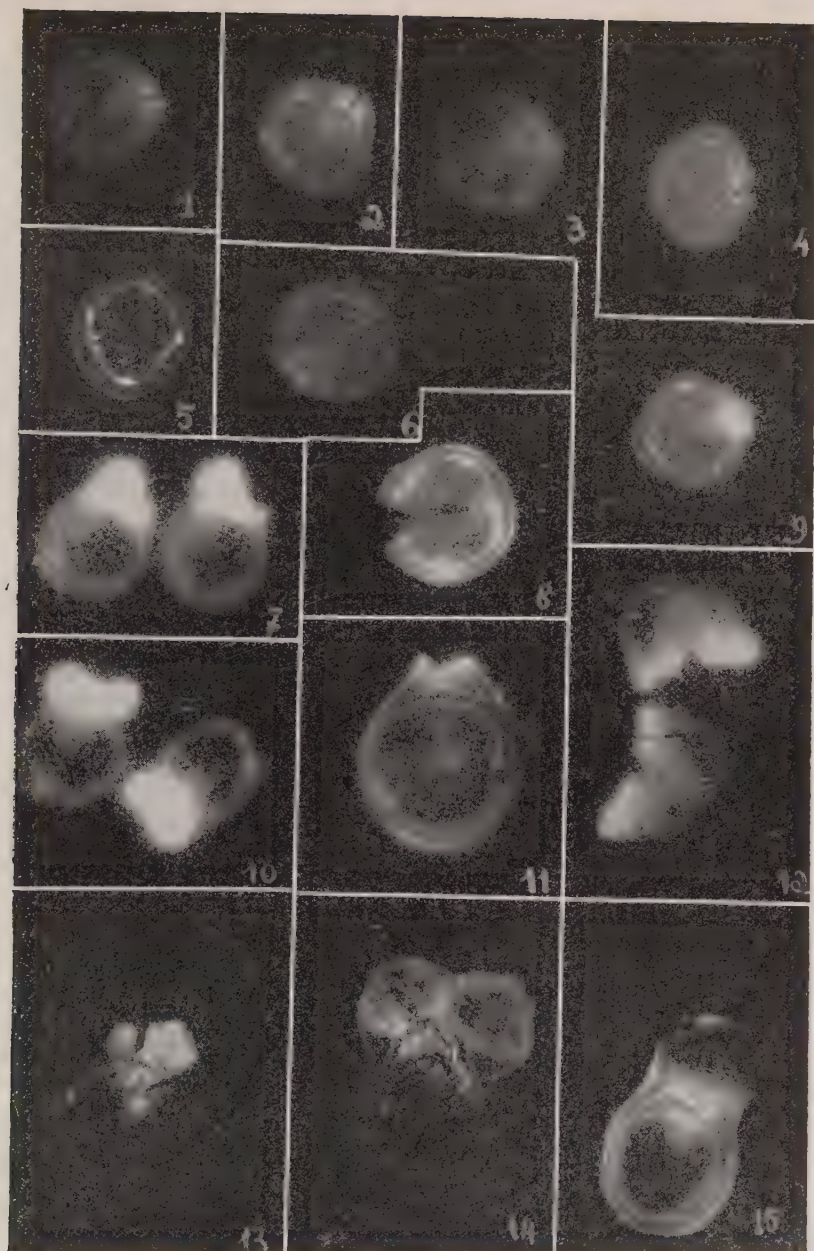
(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} juillet 1954..

terium tumefaciens, l'une très virulente, l'autre non tumorigène, et avec une souche d'un germe tout à fait étranger au phénomène étudié (*Shigella*). L'autre témoin était piqué stérilement. Les germes provenaient de cultures âgées de 48 heures, cultivés dans des conditions déjà décrites. Tous ces essais étaient doublés par des inoculations effectuées de la même manière mais avec des germes tués par la chaleur. Nous avons ainsi obtenu, à différentes périodes de l'année, des tumeurs d'âges divers et finalement nous avons pu comparer des autoradiographies provenant de sujets sacrifiés à des temps différents depuis trois jours jusqu'à quatre-vingt-dix jours après l'inoculation.

RÉSULTATS. — A. — Sur les coupes de tissus sains, à la base comme au sommet, on retrouve la répartition déjà décrite du radiophosphore que nous rappellerons brièvement. Le phosphore se décèle facilement au niveau de l'anneau vasculaire où il atteint sa plus forte concentration, puis il se manifeste à la périphérie de l'écorce mais de façon moins intense, enfin, en augmentant le temps de pose un peu au détriment de la netteté des localisations précédentes, on peut observer un noircissement plus faible au niveau de l'écorce tout entière à l'exclusion de la moelle.

B. — Sur des coupes passant par le point d'inoculation, il faut distinguer deux cas. Le premier comprend *toutes* les inoculations qui ne donneront pas de tumeurs, c'est-à-dire qui correspondent à des piqûres stériles ou à des piqûres faites avec des germes inactifs appartenant à des souches non virulentes ou ayant été tuées par la chaleur. Le second ne correspond qu'aux *seules* inoculations faites avec des germes vivants, virulents, tumorigènes. Dans le premier cas, et au cours des premiers jours, il n'y a pas ou presque pas d'accumulation de radiophosphore aux bords de la plaie. Quelquefois, lorsque l'aiguille est passée très près d'un faisceau vasculaire, ce dernier semble alors le siège d'une radioactivité plus forte, mais les parenchymes en voie de cicatrisation dans la même coupe et ceux qui leur correspondent dans les coupes voisines au-dessus et au-dessous du plan du point d'inoculation n'accumulent pas de phosphore.

Dans le second cas, on constate au contraire, avec certitude dès le huitième jour, que la présence du germe actif tumorigène s'accompagne d'un afflux considérable de radioisotope au niveau de la plaie. D'abord situé au niveau de l'anneau vasculaire qui a été sectionné par l'aiguille, le phénomène se manifeste par un noircissement intense et très bien localisé sur l'autoradiographie. Puis il s'étend plus discrètement comme un liséré aux contours de la plaie. Il est visible sur les coupes adjacentes, ce qui est en rapport avec un appel de liquide, sorte d'œdème provoqué par la piqûre infectée qui a été décrit et étudié par Riker (1923). Stout et Hoagland (1939), en étudiant l'ascension et le mouvement latéral du radiophosphore dans le géranium non infecté, ont



Autoradiographies (tirage sur papier par agrandissement, 4 ×
à partir des originaux) *Pelargonium zonale*.

1. Piqûre stérile, ^{32}P , trois jours ; 2. Germe actif, ^{32}P , huit jours ; 3. Germe tué, ^{32}P , huit jours ; 4. Germe vivant, actif, ^{32}P , huit jours ; 5. Piqûre stérile, sommet, ^{35}S , cinq jours ; 6. Piqûre stérile, ^{32}P , cinq jours ; 7. Germe actif, tumeur, ^{32}P , trente jours ; 8. Germe actif, ^{90}Sr , douze jours ; 9. Germe actif, ^{32}P , sept jours ; 10. Tumeur, ^{32}P , vingt-cinq jours ; 11. Tumeur, ^{32}P , treize jours ; 12. Tumeur, ^{32}P , vingt jours ; 13. Tumeur, ^{35}S , trente-et-un jours ; 14. Tumeur, ^{35}S , soixante-dix jours ; 15. Tumeur, ^{90}Sr , soixante-dix jours.

montré que dans ce cas les éléments radioactifs sont transférés rapidement latéralement du bois vers l'écorce mais ne se déplacent que très lentement dans le sens vertical à l'intérieur de l'écorce. C'est par les vaisseaux du bois que l'ascension des sels se fait rapidement dans la plante.

Enfin, quand la prolifération tumorale commence, le radiophosphore s'accumule avec une intensité très grande, souvent décroissante de la périphérie vers le centre de la coupe, et le phénomène se poursuit aussi longtemps que la tumeur s'accroît.

C. — Les autoradiographies obtenues par suite de l'ascension dans les plantes de *radiosoufre* à l'état de sulfate sont naturellement moins denses. Sur des coupes de tissus sains, la localisation de ^{35}S s'effectue avec une forte intensité dans les vaisseaux, ce qui, comme dans le cas précédent avec le ^{32}P , ne correspond pas seulement à un « marquage » de la sève. Avec le soufre, les massifs de vaisseaux anciens et même le liber sont très radioactifs. La zone génératrice libéro-ligneuse qui les sépare s'identifie facilement sur les autoradiographies par son absence totale de radioactivité. De plus, le soufre manifeste sa présence dans l'épiderme et même dans les poils auxquels correspond une trace radioactive parfois très nette. Par contre, le parenchyme de l'écorce qui s'était montré capable de retenir une certaine quantité de radiophosphore ne manifeste aucune radioactivité après emploi du radiosoufre, pas plus que le parenchyme médullaire. Cette observation est en accord avec les résultats de Wanner (1952) concernant la circulation des phosphates dans le parenchyme d'assimilation. Au niveau d'une piqûre stérile le radiosoufre est présent dans l'anneau vasculaire et dans l'épiderme où il a tendance à s'accumuler très exactement sur la section de ces deux tissus aux bords de la plaie. Cela se traduit sur les autoradiographies par des taches qui sont dans ces régions bien délimitées, plus denses que les taches voisines et à contours plus diffus. Les tissus voisins de l'écorce et de la moelle ne sont pas radioactifs. Dans les tissus tumoraux, avec les moyens grossiers que nous avons employés jusqu'à présent, la répartition du radiosoufre paraît se juxtaposer assez bien à celle du radiophosphore. Les localisations les plus denses correspondent à des formations libéro-ligneuses irrégulières, mais tout le tissu tumoral est riche en soufre, d'autant plus que la tumeur est plus jeune et plus proliférante.

D. — L'ascension du radiostrontium a été étudiée de la même manière que celle du radiophosphore et du radiosoufre. Les autoradiographies obtenues montrent à la base comme au sommet de la plante que ce sont les tissus conducteurs qui manifestent la plus forte radioactivité. De plus, et même en quelques heures, il apparaît déjà sur les radios des ponctuations très denses corres-

pendant aux cristaux d'oxalate mâclés en oursins. On est donc en droit d'espérer, avec une bonne approximation, que le strontium radioactif peut nous donner des indications sur le métabolisme du calcium. Comme dans les cas précédents et encore plus nettement la cicatrice due à une piqûre stérile ne présente pas après vingt-quatre heures d'accumulation de radioélément aux bords de la plaie. Sur les autoradiographies, les traces sont à bords francs sans noircissement plus intense que celui des tissus voisins. A ce même niveau, l'autoradiographie d'une coupe passant par le point d'inoculation d'une plante infectée par un germe tumorigène présente dans les premières heures un aspect tout à fait semblable au précédent. C'est dans une plage diffuse, assez étendue, dans les parenchymes bordant la plaie que le radiostrontium se manifeste. L'accumulation de ^{32}P en certains points de la plaie d'inoculation ne se superpose donc pas topographiquement à celui de ^{90}Sr . C'est seulement le phosphore et le soufre venant de la plante qui semblent s'accumuler en quantités importantes dans les régions où se trouvent d'abord les bactéries. Nous reviendrons ultérieurement sur la destinée du radiostrontium dans les tumeurs plus âgées, mais nous pouvons indiquer dès maintenant que sa répartition se fait surtout dans le tissu en voie de transformation qui présente déjà des caractères différents des tissus sains et que l'on appelle tissu connexe.

DISCUSSION.

Nous retiendrons le fait que le radiostrontium a une répartition particulière dans les tissus tumoraux et les tissus voisins comme un argument en faveur de la coïncidence significative de la localisation de radiophosphore et du radiosoufre dans ces mêmes tissus.

On sait que l'activité du cambium dans les plantes blessées devient atypique. Après infection de la plaie par *Agrobacterium tumefaciens*, les premières étapes dans la formation de la tumeur ressemblent à des réactions de blessures. C. Noël (1946) a donné une étude comparative précise de l'anatomie du crown-gall. Il est apparu que, dans la phase d'induction telle que l'a définie plus tard Brown, il est difficile de mettre en évidence des structures caractéristiques. Pourtant cette période pourrait être définie par des caractères biochimiques. Klein, Rasch et Swift (1953) ont montré qu'il existe une brusque élévation du taux du phosphore contenu dans l'acide désoxyribonucléique au cours des deux premiers jours qui suivent l'inoculation. Ils considèrent ce résultat comme une action spécifique des cellules en voie de tumorigénération ou comme un produit de la bactérie virulente induisant la tumeur. Notre méthode, sans doute trop imprécise, ne nous

a pas permis de mettre en évidence une accumulation précoce du radiophosphore. Il nous a semblé bien souvent qu'une concentration plus forte du ^{32}P et même du ^{35}S aux bords de la plaie d'inoculation pouvait caractériser, dès les deux ou trois premiers jours l'inoculation par un germe *actif*. Mais il y a trop d'incertitude dans la comparaison de deux radiographies pour que nous puissions en tirer une conclusion valable. Nous reprendrons cette étude avec des moyens différents. Par contre, il apparaît d'une façon indubitable que la prolifération tumorale s'accompagne d'une incorporation massive de radiosoufre et de radiophosphore. Howard et Pelc (1951) ont étudié par autoradiographie l'incorporation de radiosoufre et de radiophosphore dans le noyau et la synthèse de l'acide désoxyribonucléique en utilisant les racines de *Vicia faba*. Dans des conditions expérimentales très voisines des nôtres, ils décèlent la présence du phosphore dans l'acide nucléique, les phosphoprotéines et quelques phospholipides. Sur leur matériel la plus grande partie du phosphore est présente dans l'acide désoxyribonucléique et disparaît des autoradiographies provenant de préparations soumises à l'action contrôlée de la désoxyribonucléase. Nous avons fait un essai comparable avec le même enzyme sans résultat positif. Le radiosoufre, après la fixation et l'hydrolyse, ne peut subsister à l'état de sulfure organique ni de composé acidosoluble (histones) ; il est donc associé vraisemblablement aux nucléoprotéines.

RÉSUMÉ.

1° Le phosphore s'accumule dans le parenchyme d'assimilation où sa présence est justifiée entre autres par la phosphorylation des sucres.

2° Dans les tissus tumoraux, en présence des bactéries actives, et là où il y aurait synthèse des acides nucléiques, le phosphore et le soufre affluent ensemble.

3° Dans les tissus connexes, où il n'y a pas de concentration très grande ni en soufre ni en phosphore, on constate une surcharge en strontium, c'est-à-dire en calcium.

BIBLIOGRAPHIE

- A. HOWARD et S. R. PELC. *Ciba Foundation Conference*, 1951, 138.
R. M. KLEIN, E. M. RANCH et H. SWIFT. *Cancer Res.*, 1953, **13**, 499.
P. MANIGAULT. *Ces Annales*, 1953, **85**, 602.
C. NOËL. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, II^e série, 1946, **7**, 87.
A. J. RIKER. *J. agric. Res.*, 1932, **25**, 119.
P. R. STOUT et D. R. HOAGLAND. *Amer. J. Bot.*, 1939, **26**, 320.
H. WANNER. *Planta*, 1952, **41**, 190.

ULTRACENTRIFUGATION

DES CÉNAPSES LIPOPROTÉIQUES

par PIERRE REBEYROTTE et PIERRE SLIZEWICZ (*).

(*Faculté de Médecine, Laboratoire du professeur M. Polonovski.*
Institut Pasteur, Service des Virus [professeur P. LÉPINE].)

L'ultracentrifugation préparative du sérum de cheval additionné de bromure de potassium a permis à l'un de nous [1] de séparer deux fractions protéiques dont la densité est nettement inférieure à 1,25. Nous nous sommes demandé quels pouvaient être les rapports entre ces fractions et les cénapses lipoprotéiques acido-précipitables de Machebœuf que l'on isole par voie purement chimique [2].

Nous avons donc étudié l'influence de la concentration, de la densité et du pII sur la constante de sédimentation d'une solution de cénapses.

MATÉRIEL-MÉTHODE.

Les cénapses ont été préparées par la méthode originale de Machebœuf [2]. Elles contenaient 30 p. 100 de lipides déterminés par la méthode de Delsal [3]. La solution mère (49 mg de cénapses par centimètre cube) a été diluée soit avec de l'eau salée à 8,5 p. 1 000 afin d'étudier l'influence de la concentration sur la valeur de la constante de sédimentation, soit avec des solutions de bromure de potassium de concentrations différentes, afin d'étudier l'influence de la densité du milieu. La technique d'ultra-centrifugation et les calculs sont ceux que nous avons précédemment décrits [1, 4].

I. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SUR LA VITESSE DE SÉDIMENTATION.

D'une manière générale la vitesse de sédimentation augmente quand la concentration de la solution protéique diminue : c'est

(*) Manuscrit reçu le 18 août 1954.

le cas en particulier pour le virus de la mosaïque du tabac [5], le fibrinogène [6], l'albumine de bœuf [7], la lactoglobuline [8]. La vitesse de sédimentation est dans ce cas une fonction linéaire (1) de la concentration de la forme :

$$S = S_0 - ac$$

a étant un coefficient expérimental différent pour chaque protéine. c la concentration exprimée en grammes pour 100 cm³ de solution, S_0 la valeur extrapolée à la concentration zéro.

Nous avons effectué 4 ultracentrifugations sur des solutions de

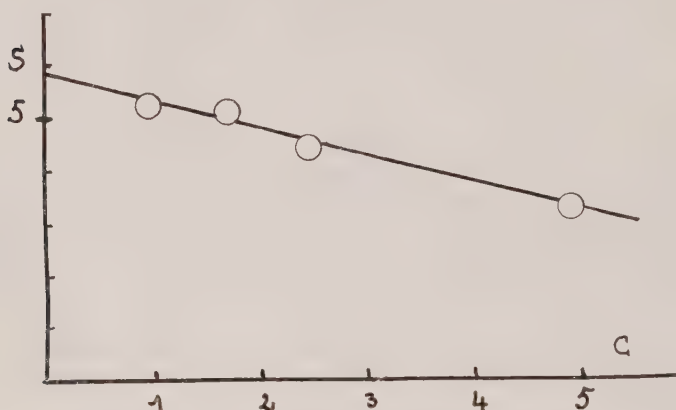


FIG. 4. — En abscisses les concentrations en grammes pour 100 cm³ de solution. En ordonnées les vitesses de sédimentation en unités Svedberg.

cénapses dont les concentrations variables se situaient entre 4,9 p. 100 et 0,98 p. 100. La figure 1 montre que la vitesse de sédimentation des cénapses est très sensiblement une fonction linéaire de la concentration. On trouve par extrapolation à la concentration zéro une valeur $S_0 = 5,8$ S (2).

Ainsi que le montre la figure 2 a, l'ultracentrifugation révèle une fraction protéique unique alors que l'électrophorèse Tiselius (fig. 3, pH 7,2) montre dans la même préparation deux constituants.

(1) Pour d'autres auteurs, en particulier pour Golder [9], cette variation s'exprimerait sous la forme d'une fonction hyperbolique :

$$S = \frac{S_0}{1 + Ac}$$

(2) Les constantes de sédimentation s'expriment généralement en unités Svedberg, 1 unité Svedberg = 1 S = 10⁻¹³ cm/sec. dyne.

II. — INFLUENCE DE LA DENSITÉ DU MILIEU SUR LA VITESSE DE SÉDIMENTATION.

Nous avons montré [4] que lorsqu'on augmente la densité du sérum de cheval par addition de bromure de potassium, les vitesses de sédimentation des différentes fractions diminuaient. Pour les cénapses un milieu de densité convenablement choisi pouvait, peut-être, nous permettre de séparer les deux constituants dont la teneur en lipides semble différente (3). La figure 2 *b* représente le diagramme d'ultracentrifugation d'une solution de cénapses à 0,98 p. 100 dans un milieu de densité égale à 1,18 (272 mg de bromure de potassium par centimètre cube). Un seul



FIG. 2. — Diagrammes d'ultracentrifugation : concentration 0,98 %; a, 80 minutes de centrifugation à 660 t/s — densité : 1,0; b, 60 minutes de centrifugation à 660 t/s — densité : 1,18; c, 75 minutes de centrifugation à 670 t/s — densité : 1,25; d, 80 minutes de centrifugation à 666 t/s — densité : 1,28.

pic est visible : il correspond à une vitesse de sédimentation égale à 1,55 S.

Si on admet que la vitesse de sédimentation varie d'une façon linéaire avec la densité du milieu, celle des cénapses doit s'annuler pour une densité de 1,25. C'est ce que montre la figure 2 *c* où après soixante-quinze minutes de centrifugation à 670 tours/seconde, aucune frontière de sédimentation n'est visible. On obtient des courbes analogues pour des concentrations en bromure de potassium telles que la densité du milieu soit égale à 1,28 ou 1,34. Il ne se fait dans la cellule aucune séparation ni dans le sens de la centrifugation, ni en sens contraire. Il ne semble donc pas y avoir de rapports entre les cénapses lipoprotéiques acidoprécipitables et les fractions protéiques que nous avons pu isoler par ultracentrifugation préparative.

III. — INFLUENCE DU pH SUR LA VITESSE DE SÉDIMENTATION.

Nous avons effectué avec une même préparation de cénapses à la concentration de 0,6 p. 100, 4 ultracentrifugations à des pH différents. Les résultats sont les suivants :

pH	8,6	7,2	6,2	5,2
S	4,2	4,8	4,9	4,7

(3) En effet, la coloration des lipides, après électrophorèse sur papier n'a pas la même intensité pour les deux constituants [40].

Etant donnée la précision de nos mesures, on peut considérer que la vitesse de sédimentation est pratiquement indépendante du pH.

Ici encore, les résultats de l'ultracentrifugation et de l'électrophorèse sont nettement différents. L'ultracentrifugation ne nous révèle dans tous les cas qu'un seul constituant.

Par contre, plus on s'éloigne de pH 4,7 où les mobilités électrophorétiques étant faibles, les deux constituants sont confondus, plus la séparation en deux constituants devient évidente. Ainsi à pH 8,6 la première fraction a une mobilité

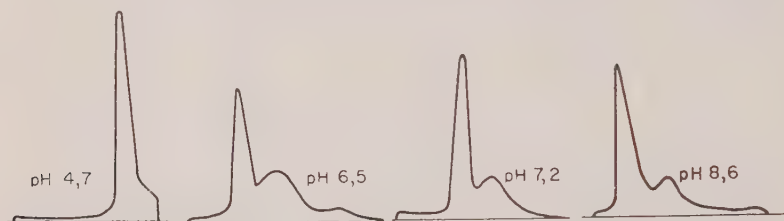


FIG. 3. — Diagramme d'électrophorèse à différents pH; concentration 1 %/o. Tampon véronal acétate $\Gamma/2 = 0,45$; champ 5 V/cm; $t = 10\ 800$ secondes.

de cristalbumine et la deuxième fraction prend celle d'une globuline α (fig. 3).

DISCUSSION.

1. Les valeurs des vitesses de sédimentation des cénapses en solution à différentes concentrations sont peut-être inversement proportionnelles aux valeurs que prend la viscosité de ces solutions. Schachmann et Kauzmann [5] ont déjà remarqué que le produit, des vitesses de sédimentation du virus de la mosaïque du tabac à différentes concentrations et des rapports $\frac{\eta}{\eta_0}$ des viscosités de ces solutions et de l'eau, était constant. Il est difficile de savoir quelle est la viscosité qui intervient dans la sédimentation des molécules protéiques. Rappelons que les premiers travaux de Svedberg ont été réalisés avec des sols métalliques : dans ce cas la viscosité qui entre en jeu est sans ambiguïté celle de la phase dispersante.

2. Oncley et Gurd [41] pensent que l'on peut déterminer la densité des molécules protéiques en solution en étudiant la valeur de la vitesse de sédimentation dans des solutions salines de densité variable. Par extrapolation la densité correspondant à une vitesse de sédimentation nulle est celle de la protéine. Le résultat que nous trouvons dans le présent travail est en bon

accord avec celui antérieurement trouvé par Machebœuf, Delsal, Lépine et Giuntini [12] qui plaçaient la densité des cénapses entre 1,17 et 1,30. On peut se demander malgré tout si les solutions salines très concentrées que l'on est amené à employer ne provoquent pas des modifications de structure ou de forme : la densité de la solution ne serait plus alors l'unique facteur intervenant pour modifier la vitesse de sédimentation.

3. La vitesse de sédimentation des cénapses ne paraît pas dépendre du pH du moins entre pH 5,2 et pH 8,6. Ce résultat a d'ailleurs été établi antérieurement pour un grand nombre de protéines. La zone de pH où la vitesse de sédimentation est indépendante du pH est généralement assez étendue.

RÉSUMÉ. — La constante de sédimentation d'une préparation de cénapses lipoprotéiques acidoprécipitables extrapolée à une concentration nulle est égale à 5,7 S.

Si on modifie la densité du milieu par addition de bromure de potassium la vitesse de sédimentation diminue. Elle s'annule pour une densité égale à 1,25. Quelle que soit la densité du milieu, l'ultracentrifugation analytique est incapable de mettre en évidence les deux composants que révèle au contraire l'électrophorèse Tiselius.

Entre pH 5,2 et 8,6 la vitesse de sédimentation des cénapses est pratiquement constante.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. SLIZEWICZ. *Ces Annales*, 1954, **86**, 189.
- [2] M. MACHEBOEUF. *Thèse Sciences*, Paris, 1928.
- [3] J. L. DELSAL. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1947, **29**, 690.
- [4] P. SLIZEWICZ. *Ces Annales*, 1953, **85**, 503.
- [5] H. K. SCHACHMANN et W. J. KAUFMANN. *J. Phys. Coll. Chem.*, 1949, **53**, 150.
- [6] V. L. KOENIG et J. D. PERRINGS. *Arch. Biochem.*, 1952, **36**, 147.
- [7] V. L. KOENIG et J. D. PERRINGS. *Arch. Biochem.*, 1952, **41**, 367.
- [8] G. L. MILLER et R. H. GOLDBERGER. *Arch. Biochem.*, 1952, **36**, 249.
- [9] R. H. GOLDBERGER. *J. Amer. chem. Soc.*, 1953, **75**, 1739.
- [10] P. REBEYROTTE. *Thèse Université Paris*, 1954.
- [11] J. L. ONCLEY et F. R. N. GURD. *The lipoproteins of human plasma in blood cells and proteins*. Academic Press Inc., New-York.
- [12] M. MACHEBOEUF, J. L. DELSAL, P. LÉPINE et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1943, **69**, 321.

UNE NOUVELLE ESPÈCE
DE *STREPTOMYCES* PRODUCTRICE D'ANTIBIOTIQUES :
***STREPTOMYCES AMBOFACIENS* n. sp.**
CARACTÈRES CULTURAUX

par M^{me} S. PINNERT-SINDICO (*).

(Laboratoires de Recherches, Rhône-Poulenc.)

Au cours de recherches systématiques de souches de *Streptomyces* productrices d'antibiotiques, nous avons isolé d'un prélèvement de terre effectué dans la région de Péronne (Somme) une souche désignée provisoirement par l'appellation « *Streptomyces* 3486 », qui s'est montrée douée de propriétés antibiotiques particulièrement intéressantes.

À partir de cultures de cette souche en milieu liquide, il a en effet été possible d'isoler deux antibiotiques différents.

Le premier, qui a été nommé spiramycine, possède des caractères qui permettent de le considérer comme un antibiotique nouveau ; ses propriétés physiques, chimiques et son action antibactérienne, qui feront l'objet d'une publication séparée, le rapprochent des substances du groupe érythromycine-carbomycine, sans cependant permettre de l'identifier à aucune de celles déjà décrites.

Par l'ensemble de ses caractères physiques, chimiques et biologiques, le second antibiotique a pu être identifié à la congocidine, décrite antérieurement [1], qui avait été isolée au cours du même programme de recherches, à partir de cultures d'une autre espèce de *Streptomyces*, désignée par le n° 1142.

La comparaison des propriétés morphologiques et biochimiques de la souche 3486 avec celle des espèces décrites [2, 3] nous ayant permis de conclure qu'elle se différencie de ces dernières, nous la considérons comme une espèce nouvelle, que nous proposons de nommer *Streptomyces ambofaciens*, pour rappeler qu'elle produit deux antibiotiques différents. Nous donnons ci-après les propriétés permettant de la caractériser et de l'identifier.

(*) Manuscrit reçu le 15 septembre 1954.

DESCRIPTION.

S. ambofaciens a montré, au cours des essais d'identification, des caractères assez variables, tant du point de vue morphologique que biochimique. L'ampleur de ces variations s'accroît encore lorsque la souche est soumise à l'action des inducteurs classiques de mutation tels que les rayons ultra-violets ou l'ypérite azotée, et certains mutants s'éloignent sensiblement de la souche mère, en particulier en ce qui concerne la couleur du mycélium végétatif et de l'appareil aérien. Les caractères que nous décrivons ci-dessous sont ceux que nous avons le plus fréquemment observés pour la souche originale.

FORME DES COLONIES. — Sur la gélose à l'asparagine, en boîtes de Petri, lorsque l'ensemencement est dense, les colonies monospores restent petites, rondes, hémisphériques, ou à dépression centrale légère. Lorsque les colonies sont moins nombreuses, leur diamètre peut atteindre 10 mm. Le mycélium végétatif est jaunâtre, à bords lobés ; il forme des plis suivant les rayons et plusieurs bourrelets concentriques ; il existe en général une dépression centrale plus ou moins accusée où des craquelures peuvent se produire. Le mycélium aérien, qui recouvre en général toute la colonie, est d'abord blanc et très rapidement prend une teinte grise au moment de la sporulation qui peut se produire plus intensément sur le pourtour de la colonie, avec tendance à former des arborescences autour de la colonie (pl. I, fig. 1).

MORPHOLOGIE MICROSCOPIQUE. — L'étude de la morphologie microscopique a été faite au moyen de cultures sur lames en milieu de Czapek. *S. ambofaciens* produit des filaments ramifiés. Dans des conditions favorables de culture, on peut observer rapidement la formation des éléments sporulés qui se présentent sous la forme de chaînes de spores enroulées en spirales, rattachées au filament principal, soit isolément, soit par groupes insérés en un même point du filament principal, ou encore portés par un court conidiophore. A l'aisselle des filaments sporulés, on rencontre en général un filament non segmenté, également en forme de vrille. Les spores sont ovales à sphériques. Les photomicrographies ci-après (pl. I, fig. 2 ; pl. II, fig. 3, 4) montrent quels aspects de la sporulation de *S. ambofaciens*.

CARACTÈRES CULTURAUX ET PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — *S. ambofaciens* forme en général un mycélium végétatif incolore à jaune, un mycélium aérien blanc à blanchâtre se colorant très rapidement en gris foncé. Il produit suivant le milieu un pigment jaune, brun, ou brun rougeâtre très faible, ou ne produit aucun pigment. Le tableau I rassemble les principaux caractères cultu-

TABLEAU I. — Caractères cultureux de *S. ambrosiacus*.

MILIEUX	MYCÉLIUM VÉGÉTATIF	MYCÉLIUM AÉRIEN	SPORULATION	EXOPIGMENT
Gélose synthétique (milieu de Crapek) [<i>The Act.</i> n° 1].	Jaunâtre à grisâtre, se développant presque uniquement sous la surface. La culture au dessus de la surface est limitée presque entièrement au mycélium aérien.	Blanc, virant au gris au moment de la sporulation.	Rapide.	Très faible, brun jaunâtre.
Gélose synthétique au glucose.	Jaunâtre à orangé.	Blanc jaunâtre.	Plus tardive, grisâtre.	Très faible, brun rougeâtre.
Gélose à l'asparagine (<i>The Act.</i> n° 3).	Jaunâtre, lobé.	Blanc.	Grise à légère tendance jaune verdâtre. Peut former des arborescences sur les bords de la colonie	Faible, jaune brun.
Gélose au malate de calcium.	Développement rapide, semblable à celui sur milieu		synthétique (n° 1).	Pas d'exopigment.
Gélose à la tyrosine (<i>The Act.</i> n° 4).	Développement à peu près nul.			Pas d'exopigment.
Bouillon glucosé (<i>The Act.</i> n° 16).	Développement moyen jaunâtre. Anneau et flocons.	Très peu développé.		Jaune ambré faible ou pas de pigment.
Bouillon peptoné gélosé (<i>The Act.</i> n° 5).	Jaune ambré.	Blanc sur les bords de la culture.		Jaune brun faible ou pas de pigment.
Gélose peptonée glucosée.	Jaunâtre.	Peu développé, blanchâtre.	Présence ou absence suivant les cultures ; gris jaunâtre si présence.	Faible, brun jaunâtre ou pas de pigment.
Milieu d'Emerson.	Jaune orangé à jaune brun.	Blanc, plus développé sur les bords de la culture.	Présence ou absence suivant les cultures ; gris jaunâtre si présence.	Variable ; brun faible à brun rougeâtre pouvant colorer le fragment de pomme de terre et l'eau au fond du tube.
Pomme de terre.	Brun clair à brun foncé suivant les cultures.	Surface poudreuse à reflet grisâtre.	Présence ou absence suivant les cultures ; grisâtre.	

raux ; les milieux de culture utilisés ont été préparés pour la plupart d'après les formules publiées par Waksman dans *The Actinomycetes* [4]. Les numéros donnés aux différents milieux dans *The Actinomycetes* ont été conservés ici et désignés : (*The Act.*, n° ...).

Propriétés biochimiques. — Lait à 26° : cultures formant voile. Peptonisation partielle en un mois, sans coagulation apparente. La zone peptonisée prend une teinte orangé brun ou rougeâtre. Sur lait au pourpre de bromocrésol : pH inchangé ou évoluant vers l'alcalinité suivant les cultures.

Lait à 37° : développement moins bon. Flocculation occasionnelle, peptonisation partielle.

Gélatine (*The Act.*, n°s 7 et 8) : liquéfaction moyenne. Voile jaunâtre et flocons jaunâtres dans la partie liquéfiée. Pigment : variable, brun orangé faible dans la partie liquéfiée, plus accusé sur le milieu glucosé.

Nitrites : la réduction des nitrates en nitrites est moyenne ou faible en milieu synthétique, nulle en milieu organique.

Utilisation de différentes sources de carbone : ces essais ont été effectués au moyen de la méthode de Pridham et Gottlieb [5].

Les éléments bien utilisés sont les suivants : glycérine, arabinose, glucose, galactose, lévulose, mannose, lactose, rhamnose, amidon, mannite. Les éléments utilisés plus lentement (cultures bien développées mais plus tardives), ou peu utilisés, ou utilisés de façon irrégulière suivant les essais, sont les suivants : xylose, saccharose, maltose, inosite. Les éléments non utilisés sont les suivants : raffinose, érythrite, dulcité, sorbite.

CLASSIFICATION SYSTÉMATIQUE.

En suivant la clé pour l'identification des espèces de *Streptomyces* donnée par le *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, on peut classer *S. ambofaciens* près de *S. griseolus*, mais comme on le verra par la suite, il existe un certain nombre de différences entre *S. griseolus* et *S. ambofaciens*, de telle sorte qu'on ne peut assimiler les deux *Streptomyces* à une même espèce.

Quelques propriétés de *S. ambofaciens*, en particulier la production d'un pigment brun en milieu synthétique et sur pomme de terre, permettraient également de le rapprocher du *S. fimicarius*. Cependant, la production de pigment par *S. ambofaciens*, particulièrement dans le cas du milieu synthétique, est extrêmement faible et il diffère de *S. fimicarius* par un certain nombre d'autres caractères, tels que la couleur du mycélium aérien et des spores, ou le degré de développement sur le milieu à la tyrosine. Le tableau II rassemble les différences principales obser-

TABLEAU II. — Différences entre *S. griseolus* et *S. ambofaciens*.

	<i>S. griseolus</i>	<i>S. ambofaciens</i>
Morphologie microscopique	Spirales non observées	Présence de spirales.
Milieu synthétique	Pas d'indication de pigments.	Pigment soluble très faible, jaune brun.
Gélose nutritive (bouillon peptoné gélosé)	Brunâtre.	Jaune ambré.
Gélose peptonée glucosée	Crème devenant foncé.	Jaunâtre.
Pomme de terre	Crème à noir.	Brun clair à brun foncé.
Lait	Coagulé, peptonisé. Formation d'une pellicule rose.	Peptonisé sans coagulation apparente. On n'observe pas de pellicule rose.

vées entre *S. ambofaciens* et *S. griseolus* d'après les descriptions données pour ce dernier.

D'autre part, la classification plus récente de Waksman et Lechevalier [3] permettrait de rapprocher *S. ambofaciens* de *S. felleus* d'une part, et de *S. achromogenes* d'autre part. Cependant, il diffère du premier en particulier par la formation de vrilles, la liquéfaction de la gélatine, la production d'un pigment brun faible sur ces mêmes milieux à la gélatine, l'absence de pigment sur le milieu au malate de calcium. Il se différencie également du second par la formation de vrilles, la liquéfaction de la gélatine, l'absence de coagulation du lait.

Cependant, il semblerait qu'on puisse classer *S. ambofaciens* au voisinage de ce groupe de souches produisant un pigment brun sur pomme de terre, à mycélium aérien blanc à gris, en tenant compte cependant de ses autres caractères distinctifs tels que la formation de vrilles et la production d'un pigment brun faible sur de nombreux milieux, en particulier.

RÉSUMÉ.

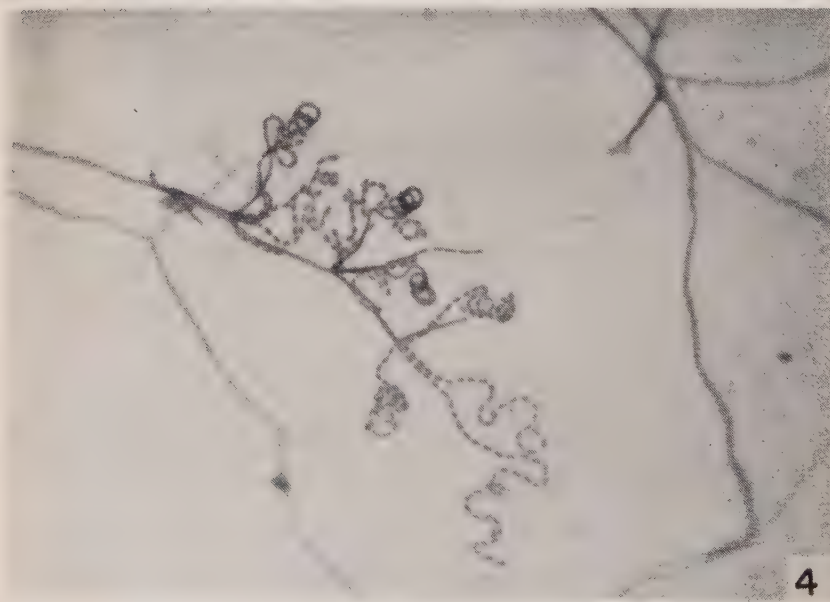
Nous avons décrit une nouvelle espèce de *Streptomyces*, *Streptomyces ambofaciens*, qui produit deux antibiotiques, l'un déjà connu, la congocidine, l'autre étant un nouvel antibiotique, la spiramycine, dont les propriétés seront décrites ultérieurement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. COSAR, L. NINET, S. PINNERT et J. PREUD'HOMME. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1498.
- [2] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6^e édit., 1948, p. 929.



3



4

PLANCHE II.

MASSON ET C^e, ÉDITEURS

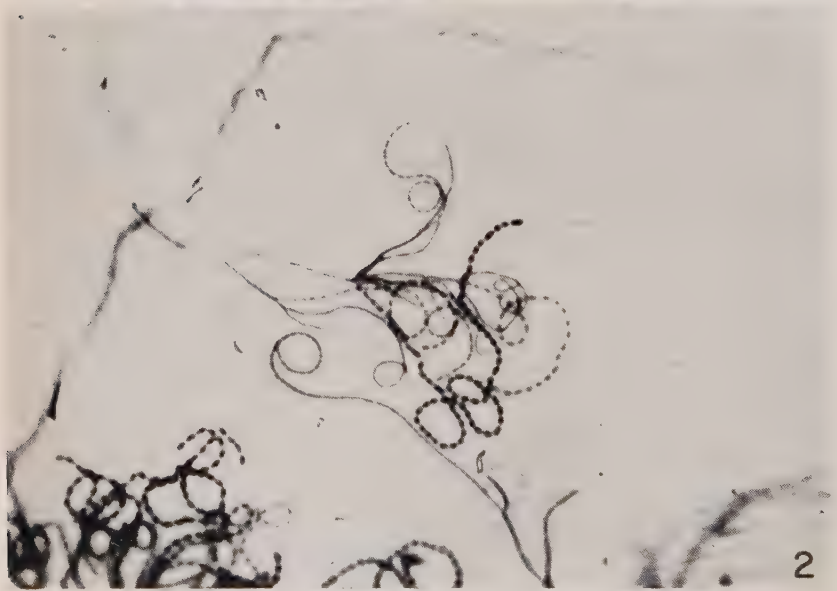


PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

- [3] S. A. WAKSMAN et H. LECHEVALIER. *Actinomycetes and their antibiotics*, Williams et Wilkins Company, 1953.
- [4] S. A. WAKSMAN. *The Actinomycetes*. Chronica botanica Company Waltham, 1950, 193-197.
- [5] T. G. PRIDHAM et D. GOTTLIEB. *J. Bact.*, 1948, **56**, 107-114.

LÉGENDE DES PLANCHES

PLANCHE I : FIG. 1. — Colonies isolées de *S. ambofaciens* sur gélose à l'asparagine.

FIG. 2. — *S. ambofaciens* : culture sur lame en milieu de Czapek (Gross. : 1 200).

PLANCHE II : FIG. 3 et 4. — *S. ambofaciens* : culture sur lame en milieu de Czapek (Gross. : 1 200).

L'ACTION DE LA PÉNICILLINE SUR LE MÉTABOLISME PROTIDIQUE DANS LES CELLULES PROLIFÉRANTES DES BACTÉRIES

[DEUXIÈME PARTIE] (*)

par LLOYD G. K. CARR et M. MACHEBOEUF.

(Institut Pasteur.)

ACTIVITÉS PEPTIDOLYTIQUES ET PROTÉOLYTIQUES DE « STAPHYLOCOCCUS AUREUS ».

Pour déterminer si la pénicilline possède la propriété générale d'empêcher l'hydrolyse peptidique dans les bactéries pendant leur croissance, nous avons choisi une autre espèce, un aérobie, à savoir *Staphylococcus aureus*, suivant les méthodes exposées dans le premier Mémoire.

Nos résultats représentatifs sont résumés dans les tableaux I et II.

De ces résultats nous pouvons conclure que l'action de la pénicilline se traduit par un empêchement du pouvoir peptidasique dans les cellules proliférantes des bactéries. Ces faits permettent de penser que cette action de la pénicilline est un phénomène général chez les bactéries. Cependant pour *Staphylococcus aureus* on ne trouve pas beaucoup d'activité peptidasique dans les surnageants. C'est pourquoi nos résultats ne concernent que les bactéries seulement.

Les résultats actuels montrent une suppression relativement sélective des activités peptidasiques de *Clostridium sporogenes* (voir premier Mémoire) et *Staphylococcus aureus* traités par la pénicilline. Ce fait n'avait pas été noté par Gorini qui travaillait avec des cultures soumises à l'action de l'antibiotique pendant un temps considérable, entraînant la lyse des bactéries.

La perte du pouvoir de dégrader les dipeptides et les polypeptides présentant un groupe NH_2 libre (aminopolypeptidase) sous l'effet de la pénicilline (à doses infra-bactériostatiques), inter-

(*) Manuscrit reçu le 15 avril 1954.

(1) Pour les autres résultats : voir Thèse de Lloyd G. K. Carr, Paris, 1954.

TABLEAU I. — *Staphylococcus aureus*.
Résultats obtenus avec 10 U. O./ml de pénicilline.

	SUBSTRATS	: Pourcentage des groupes : : NH ₂ libérés en fonction : : du temps. Témoins déduits :				: Pourcentage des groupes : : NH ₂ libérés en fonction : : du temps rapportés au nombre : : de mg. d'Azote bactérien : : total.			
		: Temps des prélèvements : : en minutes :				: Temps des prélèvements : : en minutes :			
		0	15	45	75	0	15	45	75
DIPEPTIDASE	DIGLYCINE M/10	70	80	85,5	94,5	3,3	3,36	3,59	3,75
	CYSTEINE M/6								
	Fe ⁺⁺ M/30								
	DIGLYCINE M/10								
AMINOPOLYPEPTIDASE	CYSTEINE M/6								
	Fe ⁺⁺ M/30	77	36,7	38,5	35	3,66	1,74	1,71	1
	PENICILLINE								
	10 U.O./ml.								
	LEUCYLDIGLYCINE								
	M/10								
	CYSTEINE M/6	16,6	19,2	29,7	35	0,79	0,805	1,25	1,38
	Fe ⁺⁺ M/30								
	LEUCYLDIGLYCINE								
	M/10								
	CYSTEINE M/6	21	0	8,75	5,25	1	0	0,39	0,22
	Fe ⁺⁺ M/30								
	PENICILLINE								
	10 U.O./ml.								

Incubation deux heures. Volume total 3,5 ml. Suspension 1 ml. Température 37,5 C. Tampon phosphate M/75, pH 7,8 (glycylglycine) pH 7,2 (leucylglycine). 50 ml de culture pour chaque prélèvement.

TABLEAU II. — Résultats des mesures par l'appareil de Kjeldahl et l'électrophotomètre de Meunier, 10 U. O./ml pénicilline, *Staphylococcus aureus*.

	: Lectures photométriques : : mettant en évidence la crois- : : sance de bactéries.				: Nombre de mg. D'azote : : bactérien par l'appareil : : de Kjeldahl.			
	: Temps des prélèvements : : en minutes.				: Temps des prélèvements : : en minutes.			
	0	15	45	75	0	15	45	75
Non traité	242	256	278	284	0,210	0,238	0,238	0,252
Traité avec								
10 U.O./ml.	242	250	246	254	0,210	0,210	0,224	0,238
PENICILLINE								

vient probablement de façon importante dans la toxicité de l'antibiotique.

On conçoit les répercussions de cet effet métabolique sur les processus de biosynthèse des protéines en général, s'il est vrai

qu'il existe un équilibre dynamique entre ces constituants et les amino-acides, équilibre résidant dans une dégradation et une resynthèse des liaisons peptidiques.

On peut concevoir d'autres conséquences de ce trouble : inhibition de la dégradation ou de la synthèse du glutathion, dont nous avons fait ressortir le rôle biologique indispensable.

La suppression des activités protéolytiques chez les bactéries traitées pendant la croissance par la pénicilline nous a incités à rechercher si cet effet métabolique était spécifique, ou si, dans les mêmes conditions de traitement, d'autres activités métaboliques disparaissaient également.

Nous avons donc envisagé le cas d'un autre système enzymatique, le cas d'une phosphatase.

ACTIVITÉS PHOSPHATASIQUES DE « *CLOSTRIDIUM SPOROGENES* »
ET « *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* » TRAITÉS PAR LA PÉNICILLINE
PENDANT LA CROISSANCE.

Pour notre étude de l'activité phosphatasique nous avons préparé deux flacons contenant cinq cents millilitres (500 ml) du milieu usuel (voir premier Mémoire). Ce milieu est inoculé avec 10 ml d'une culture de *Clostridium sporogenes* et 20 ml d'une culture de *Staphylococcus aureus*. On laisse les cultures croître pendant vingt heures. Elles sont ensuite traitées par la pénicilline à cinquante (50 U. O./ml) pour le *Clostridium* et à dix (10 U. O./ml) pour le *Staphylococcus*. On les laisse croître pendant une heure. Les cultures témoins ne sont pas traitées. Les cultures sont ensuite centrifugées à basse température, et les bactéries obtenues sont lavées deux fois, et finalement mises en suspension dans 5 ml d'eau bidistillée.

Les mélanges en vue d'effectuer l'étude de l'hydrolyse d'un ester phosphorique sont préparés comme suit :

Suspension.	4 ml
Tampon borate M/30, pH 7,2	4 ml
Glycérophosphate de sodium M/10	4 ml
MgCl M/100.	4 ml
Eau bidistillée	Q S.P. 5 ml

Pour la détermination de l'activité phosphatasique, nous avons employé la méthode de Macheboeuf et Delsal [4].

Après agitation pendant deux et quatre heures respectivement en anaérobiose pour le *Clostridium* et en aérobiose pour le *Staphylococcus*, les tubes contenant les mélanges sont mis immédiatement dans de l'eau glacée. 5 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 sont ajoutés aux mélanges. On prélève 3 ml de chaque tube et on y ajoute encore 3 ml d'acide trichloracétique.

Après quinze (15) minutes les mélanges respectifs sont centrifugés. 5 ml de surnageant sont conservés pour le dosage.

La préparation suivante est effectuée :

Surnageant	5	ml
Acide sulfurique concentré	0,4	ml
Solution de molybdate d'ammonium (10 % en eau)	1	ml
Solution de sulfite de sodium (20 % en eau)	1	ml
Solution acide d'hydroquinone (contenant pour 100 ml 0,5 g d'hydroquinone et 1 goutte d'acide sulfurique concentré).	1	ml
Eau	Q.S.P.	10 ml

On mélange très vite la préparation ci-dessus et on fait les lectures photométriques (écran orangé). On prépare aussi pour la solution étalon une solution de phosphate monopotassique renfermant cent μg (100 μg) de phosphore dans 1 ml (43,9 mg de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ dans l'eau q. s. p. 100 ml). Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone, donnant une coloration bleue.

**Activités phosphatasiques « *Staphylococcus aureus* »
traité par la pénicilline pendant une heure**

Suspension	1	ml
Glycérophosphate de sodium M/10	1	ml
Tampon borate M/30, pH 7,2	1	ml
Eau bidistillée	Q.S.P.	5 ml
Agitation dans l'eau, bain à 37°5 C		

CHAQUE LECTURE deux essais	MICROGRAMMES DE PHOSPHORE libérés en fonction du temps des agitations Dose selon Machebœuf et Delsal (cultures différentes)		RAPPORT DES MICROGRAMMES de phosphore libérés au nombre de mg d'azote bactérien	
	2 heures	4 heures	2 heures	4 heures
Témoin non traité	40,3	78,38	4,11	31,2
Pénicilline 10 U.O./ml	48,9	103,97	7,18	44

**Résultats des mesures par l'appareil de Kjeldahl
« *Staphylococcus aureus* », 10 U.O./ml de pénicilline.**

	NOMBRE DE MG D'AZOTE BACTÉRIEN décelé par l'appareil de Kjeldahl Temps des agitations en heures (cultures différentes)	
	2 heures	4 heures
Non traité	2,506	2,506
Traité avec 10 U.O./ml	2,632	2,408

On trouvera les résultats de nos expériences dans les tableaux ci-joints pour *Staphylococcus aureus*. Il suffit de dire que nous avons obtenu des résultats similaires avec *Clostridium sporogenes* [4].

On voit que l'activité phosphatasique est augmentée.

EXPLICATIONS POSSIBLES DE CE PHÉNOMÈNE.

A. — Peut-être y a-t-il une modification de la texture superficielle des bactéries favorisant la combinaison enzyme-substrat. Cette hypothèse a déjà été avancée par Hotchkiss [2] pour le mode d'action de la gramicidine. Hotchkiss a suggéré que des bactéries lavées, préalablement traitées par un antibiotique (gramicidine), puis mises en suspension dans un tampon, sont obligées de faire un réarrangement de leur matériel cellulaire ou d'utiliser les substrats qui ont été fournis dans les expériences. Si l'on peut, dans ces circonstances, détecter une altération du métabolisme, il y a beaucoup plus de chances que ce soit, sinon dans l'altération principale, du moins dans la chaîne des événements ayant un effet sur la croissance des cellules.

B. — Il faut considérer une autre possibilité, à savoir : les compétitions dans la biosynthèse des enzymes. Les observations de Monod [8, 9] sur les bactéries et les travaux de Spiegelman [11, 12, 13] sur l'adaptation enzymatique chez les levures prouvent que des interactions compétitives existent entre les systèmes formant les enzymes. De plus, Monod [9] a suggéré que peut-être la suppression d'un système enzymatique entraînerait un accroissement d'activité dans un autre système enzymatique.

Sur la nature générale de l'interaction des enzymes, Spiegelman [12] pense que l'état le plus probable entraîne la formation d'un enzyme particulier faisant intervenir une série d'enzymes qui entrent en jeu lors de sa formation. On peut penser que certains enzymes seraient utilisés préférentiellement, et quand ces enzymes tombent au-dessous de certaines valeurs critiques, d'autres enzymes sont mis en œuvre pour fournir le matériel exigé pour la formation de l'enzyme induit. La possibilité d'interaction entre deux systèmes enzymatiques ne repose pas seulement sur la similitude de leurs constitutions, mais sur la capacité des systèmes qui les forment, à entrer en compétition l'un avec l'autre. Peut-être pouvons-nous imaginer un précurseur commun pour la phosphatase et la peptidase parce que ces deux systèmes enzymatiques sont considérés comme métallo-protéiniques.

Rappelons les travaux de Maschmann [5, 6, 7] mentionnés antérieurement au sujet des complexes peptidasiques, et notons main-

tenant les opinions de Roche [10] sur les complexes phosphatases.

L'analyse des préparations purifiées de phosphatase alcaline a démontré qu'elles contiennent du magnésium ainsi qu'une quantité minime de zinc dont la plus grande partie est dialysable. Des faits similaires ont été obtenus avec la carboxylase de levure, dont la constitution est mieux définie. Par l'analyse, Roche croit que la phosphatase alcaline est une protéine possédant une activité en relation avec un complexe métallique (probablement du magnésium), avec certains groupes aminés de l'apoenzyme et un peptide dissociable. Pour expliquer les similitudes dans ces complexes protidiques on peut envisager un déplacement de compétition entre deux systèmes enzymatiques ayant un précurseur commun comme c'est probablement le cas pour la peptidase et la phosphatase, favorisant le système non bloqué. En outre, avec l'accumulation des peptides par la perte du pouvoir peptidasique, on trouverait un accroissement de l'activité phosphatasique.

Signalons que Lwoff [3], dans ses études sur les « pertes de fonctions » dans l'évolution des protozoaires et des bactéries, a suggéré que les mêmes pertes sont avantageuses dans certaines conditions. Cet auteur pense que l'absence de certaines réactions biosynthétiques tend à une économie d'énergie. C'est dire que la diminution du pouvoir de synthèse pourrait être avantageuse thermodynamiquement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. G. K. CARR. *Thèse*, Paris, 1954.
- [2] R. H. HOTCHKISS. *Adv. in Enzymology*, 1947, **4**, 153.
- [3] A. LWOFF. *Etude des pertes de fonctions chez les Microorganismes*. Hermann et C^o, Paris, 1944.
- [4] M. MACHEBOEUF et J. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 116.
- [5] E. MASCHMANN. *Biochem. Zeitschr.*, 1939, **300**, 89.
- [6] E. MASCHMANN. *Biochem. Zeitschr.*, 1939, **302**, 332.
- [7] E. MASCHMANN. *Biochem. Zeitschr.*, 1939, **303**, 145.
- [8] J. MONOD. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann et C^o, Paris, 1942.
- [9] J. MONOD. *Growth*, 1947, **11**, 223.
- [10] J. ROCHE. *Phosphatases 1950*, in *The Enzymes*, edited by G. B. Sumner and K. Myrbäck, vol. I, Part I, 473.
- [11] S. SPIEGELMAN. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, **11**, 256.
- [12] S. SPIEGELMAN. *Modern aspects of enzymatic adaptation, 1950*, in *The Enzymes*, edited by G. B. Sumner and K. Myrbäck, vol. I, part I, 267.
- [13] S. SPIEGELMAN et R. G. DUNN. *J. gen. Physiol.*, 1947, **31**, 153.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 7 Octobre 1954.

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

COMMUNICATIONS

LÉSIONS PROVOQUÉES PAR UN VIRUS MÉNINGITIQUE, ANORMAL PAR SA RÉSISTANCE, SES DIMENSIONS, SA RÉPARTITION DANS L'ORGANISME

par M. FAVRE, P. SÉDALLIAN et A. BERTOYE.

(*Institut Pasteur de Lyon.*)

Nous avons décrit récemment [4] les caractères d'une souche de virus isolé dans une méningite aiguë lymphocytaire, dont les déterminations expérimentales sur le cobaye, la souris et l'œuf incubé étaient comparables à celles que provoque le virus de la chorio-méningite, mais dont la résistance à la chaleur comme au vieillissement et la persistance inaccoutumée dans le liquide céphalo-rachidien, le sang et les selles du malade le séparaient nettement du virus d'Armstrong.

Les lésions histologiques relevées chez le cobaye expérimentalement inoculé font l'objet de la présente note.

Les cobayes dont l'amaigrissement est considérable au moment de la mort, ne présentent point de lésions macroscopiques.

Les lésions histologiques des organes sont discrètes : congestion vasculaire du foie, avec parfois quelques leucocytes ayant pénétré dans le lobule. Dans certains lobules, il a été observé des cellules hépatiques en voie de dégénérescence.

La congestion rénale, pulmonaire et cérébrale est irrégulièrement rencontrée. La congestion des méninges, sans réaction cérébrale, a été également irrégulièrement notée.

Les testicules observés présentent des lésions diffuses. Les cellules séminifères sont souvent altérées ; dans un grand nombre de tubes les spermatozoïdes ont disparu.

Mais, en appliquant aux préparations la méthode de coloration ayant permis à l'un de nous de découvrir pour la première fois les corpuscules élémentaires de la maladie de Nicolas-Favre (1), nous avons pu mettre en évidence, dans le foie, le poumon et le testicule, des corpuscules de tailles diverses, argyrophiles. Ceux-ci s'observent surtout dans le testicule, où ils sont arrondis ou oviformes, irrégulièrement répartis

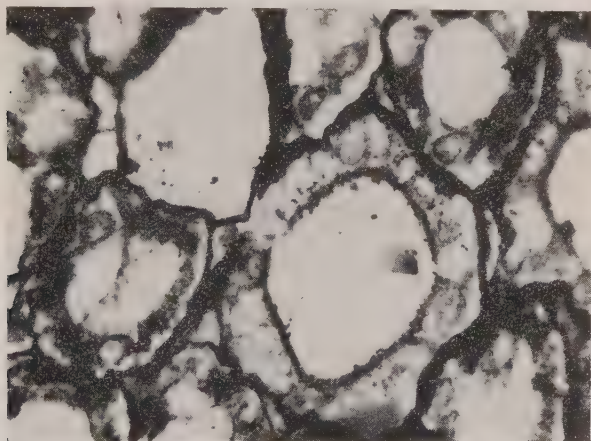


FIG. 4. — Inclusions à la surface des tubes séminifères vidés de spermatozoïdes.

dans les canaux spermatiques, prédominant dans certaines cellules à la zone de bordure, aux confins de la lumière du tube. Souvent ces

(1) Dès 1913, M. Favre observe dans des ganglions poradéniques traités par le nitrate d'argent des granulo-corpuscules dont il reprend l'étude en 1919. Il en signale l'importance dans la thèse de A. Phylactos, *Lymphogranulomatosose des ganglions inguinaux (Ulcère vénérien adénogène). Ses rapports avec le bubon climatérique*. Thèse de Lyon, 1922. Il n'ose affirmer leur valeur pathogène, mais réserve expressément la signification de ces granulo-corpuscules qu'il étudie par la suite dans de nombreuses notes [2]. En 1941, M. Levaditi pose à la Société de Dermatologie la question de savoir qui le premier a vu les granulo-corpuscules de la lymphogranulomatosose inguinale. Il donne le moyen de répondre à cette question. « Celui qui pour la première fois a vu ces corpuscules est celui qui le premier a employé sur un matériel riche en granulo-corpuscules, une méthode de coloration adéquate ». Il reconnaît que si la méthode de Giemsa des Japonais est « adéquate », une autre méthode l'est davantage encore, la méthode d'imprégnation argentique, employée par Favre dès 1912. Elle donne sur coupes de ganglions poradéniques d'admirables résultats. Il n'est pas douteux qu'il ait vu le premier le virus de sa maladie.

granulo-corpuscules sont groupés en petits amas. La plus large part des altérations des cellules testiculaires semble relever de l'action de ces granulo-corpuscules.

Ces granulo-corpuscules ont les caractères des corps élémentaires viraux. Ils fixent par leur présence une taille élevée à ce virus, qui se sépare ainsi par ce nouveau caractère des virus de chorioméningite connus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. SÉDALLIAN, A. BERTOYE, P. DÉTOLLE, G. LIMET-PILOZ et I. P. GARIN. *Ces Annales*, 1954, **86**, 785.
 [2] M. FAVRE. *Anais Brasil. Derm. Sifil.*, 1939, **14**, 249 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 182 ; *J. Méd. Lyon*, 1940, **21**, 181 ; *Ann. Derm. Syph.*, 1942, **2**, 187 ; *Ann. Derm. Syph.*, 1949, **9**, 249.

DONNÉES NOUVELLES SUR L'HABITAT ET LA CYTOLOGIE DE *CLOSTRIDIUM CORALLINUM*

par A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Dans le foie d'un porc mort avec des signes de botulisme et où nous cherchions à détecter soit la toxine botulique, soit *Cl. botulinum*, ni l'un ni l'autre n'ont été décelés ; par contre, une souche de *Cl. corallinum* var. *durieuxi* en a été isolée, ce qui porte le nombre des souches de cet anaérobie étudiées depuis 1944 à neuf.

I. Cette étude nous a d'abord permis de modifier nos conceptions sur l'habitat de ce germe. En 1948 [1] nous pensions que c'était un germe qu'on rencontrait exclusivement dans les sols (France et Sénégal). Depuis cette époque nous avons isolé *Cl. corallinum* de varechs en putréfaction et de divers organes de l'homme et des animaux :

Souche 482 : isolée en 1949, par P. de Lajudie, à Hanoï, d'un abcès profond chez un Vietnamiens (variété *joncherei*).

Souche Ga2 : isolée par Potvin, en 1951, de l'intestin d'un gardon pêché dans un étang domanial de la forêt de Rambouillet.

Souche PC₁ : isolée en 1953 de varechs en putréfaction prélevés dans la zone de balancement des marées d'une plage du Cotentin. Ces varechs étaient porteurs de taches colorées rouge-corail ; nous avions pensé qu'il existait une relation entre cette coloration et le pigment de *Cl. corallinum*. Ayant ensemencé des échantillons de varechs verts immergés en eau de mer stérile avec des cultures abondantes de la souche PC₁, nous n'avons pas réussi à provoquer le rougissement de

ces varechs, bien que le germe se soit multiplié dans cette macération. Par contre, des varechs frais stérilisés en bouillon VF glucosé et ensemencés avec la souche T₁R ou la souche PC₁ ont légèrement rougi dans la zone supérieure du tube. La même expérience répétée avec des feuilles de pommier, de poirier et de rhubarbe a montré un léger rougissement de ces feuilles dans la partie supérieure des tubes

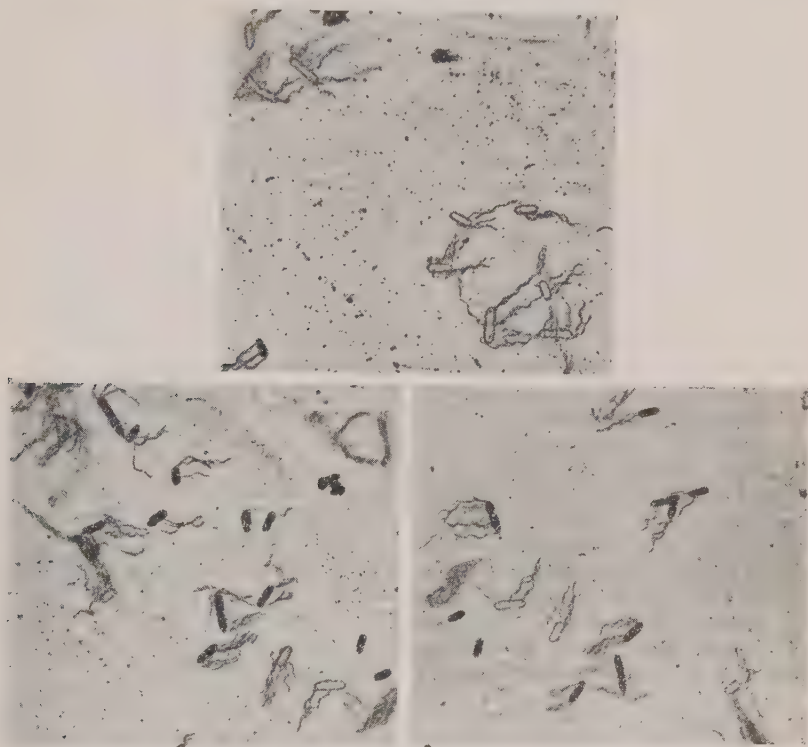


FIG. 1. — *Clostridium corallinum*. Coloration de Casarès Gill.
Gross. : $\times 850$. Photomicrographie P. Manigault.

ouverts, alors que les feuilles de lilas, de vigne et de cognassier n'ont pas présenté ce phénomène.

Souche 1116R : isolée en 1954, d'un foie de porc.

Cette souche est donc la quatrième que nous isolons hors du sol, contre cinq isolées des sols et nous pouvons maintenant définir l'habitat de *Cl. corallinum* : « Sols de France et du Sénégal, eau douce et eau de mer ; organisme humain (Asie) ; intestin du poisson ; organisme du porc ». Le cycle écologique de ce germe est donc semblable à celui de la plupart des *Clostridium* : sol, eau de mer et eau douce, intestin des animaux.

II. La souche 1116R étant particulièrement mobile, nous en avons coloré les cils par la méthode de Casarès-Gill sans modifier la technique classique, sauf le remplacement de la fuchsine acide par la fuchsine basique. Or, sur les préparations obtenues, nous avons pu observer une image que nous n'avions encore jamais vue : à côté de *Clostridium* dont le cytoplasme était fortement coloré en rouge et porteur d'une huitaine de cils, il y avait, en de nombreux points de la préparation, des corps microbiens non colorés, paraissant vidés de leur cytoplasme, transparents, mais limités par une membrane d'enveloppe très nette, linéaire, fortement colorée en rouge foncé, donnant une image très régulière semblant avoir été dessinée au trait. Nous avons demandé à notre collègue P. Manigault de bien vouloir photographier cet aspect inattendu (voir la fig. 1). Cette membrane semble être un peu plus épaisse qu'un cil, elle porte une ciliature péritriche entièrement semblable en nombre, forme et affinité tinctoriale à celle des cellules pleines. Nous ne pensons pas qu'on puisse trouver une plus belle figuration de la membrane des bactéries. Nous ne pouvons malheureusement pas expliquer pourquoi cet aspect n'apparaît jamais (à notre connaissance) dans la coloration de Casarès-Gill, ni pourquoi certaines cellules sont pleines, alors que d'autres, dans la même gouttelette, paraissent vides et réduites à leur membrane et à leur ciliature. Les seules hypothèses valables que nous puissions faire sont : 1° que *Cl. corallinum* souche 1116R constitue un matériel de choix pour l'étude de la membrane bactérienne et 2° que, suivant la loi générale d'hétérogénéité des populations bactériennes, *Cl. corallinum* présente des cellules capables de montrer plus facilement que d'autres leur membrane d'enveloppe. Il est également difficile de dire si l'organe que nous avons coloré est la paroi cellulaire, la capsule, la couche muqueuse ou la membrane cytoplasmique. Toutefois, d'après les travaux récents de Weibull (1953 [2]) nous serions plutôt enclins à penser qu'il s'agit de la membrane cytoplasmique.

Résumé. La notion d'habitat pour *Cl. corallinum* s'étend à l'organisme de l'homme et des animaux et à l'eau de mer. La membrane de *Cl. corallinum* a été colorée par la méthode de Casarès-Gill.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édition 1948, p. 157.
- [2] C. WEIBULL, *J. Bact.*, 1953, **66**, 688.

**LES VARIATIONS
DANS LA FERMENTATION DES GLUCIDES
PAR *SALMONELLA GALLINARUM*
ET *SALMONELLA PULLORUM*.
LEUR INTÉRÊT DIAGNOSTIQUE.**

par ROBERT NEEL, LÉON LE MINOR et HOSSEIN TASLIMI.

(Institut Pasteur, Paris. Institut Razi, Iran.)

Le comportement biochimique des germes du groupe *Salmonella gallinarum-Salmonella pullorum* a fait l'objet de très nombreuses études, pour la plupart d'ailleurs relativement anciennes.

Il en est résulté la description d'un certain nombre d'espèces, variétés ou types, sur lesquels les auteurs ne sont souvent pas d'accord en raison des critères biochimiques adoptés par les uns et rejetés par les autres. Parmi les travaux les plus récents, citons ceux de Pacheco et Rodriguès [1], Kauffmann [2], Delpy et Rastegar [3], Lucas et collaborateurs [4].

Finalemeut Kauffmann [5] résume la question en n'admettant l'existence que d'une seule espèce sérologique, *Salmonella gallinarum-pullorum* (1, 9, 12 : — : —), avec les deux types biochimiques classiques, *S. pullorum* et *S. gallinarum*, entre lesquels se situent un certain nombre de variantes biochimiques intermédiaires, sans qu'il soit besoin de donner à chacune d'entre elles un nom spécial.

Mais proposer une classification ou admettre l'existence de variantes biochimiques implique pour les critères retenus comme base de classification, ou l'absence de variation, ou l'existence de variations dans certaines limites bien définies.

C'est ainsi que, si l'on retient le comportement vis-à-vis d'un glucide déterminé, la variation ne pourra porter que sur des différences d'intensité ou de rapidité de la fermentation, autrement dit il s'agira d'une variation dans le positif.

Aussi Pacheco et Rodriguès [1] et Delpy et Rastegar [3] se sont-ils attachés à montrer que :

1° si des résultats discordants, voire même opposés, avaient été obtenus par divers expérimentateurs pour des souches identiques et à des époques différentes, cette discordance ou opposition était due à l'emploi de techniques non comparables (composition du milieu de culture, indicateur de réaction).

2° la transformation d'un type en un autre n'était pas possible, justifiant ainsi l'individualité des variations posées.

Or, nous avons observé un certain nombre de faits, relatifs notamment à l'utilisation des glucides, et qui sont en opposition avec les conclusions précédentes.

Nous n'avons pas en vue ici le pouvoir gazogène, dont la fixité est des plus discutables : production de gaz avec certains glucides et absence avec d'autres [1, 3], perte de cette fonction par conservation et réapparition au cours de repiquages (constatations personnelles), augmentation d'un pouvoir gazogène faible et tardif après passage *in vivo* [3], obtention de souches gazogènes à partir de souches non gazogènes (Smith et Ten Broek, Doyle), là encore par passage *in vivo* [1, 3]. Il est d'ailleurs assez paradoxal de vouloir se baser sur la production de gaz pour séparer deux variétés de *S. gallinarum* et de *S. pullorum*, alors que pour d'autres types bien individualisés sérologiquement et normalement gazogènes on a isolé des souches agazogènes, sans en faire pour cela des variétés spéciales. Nous ne citerons comme exemple que les variantes agazogènes de *Salmonella* type Dublin que nous avons eu l'occasion de rencontrer.

Nous ne voulons considérer au contraire que des variations indiscutables observées dans la fermentation de trois glucides sur lesquels repose essentiellement le diagnostic des variétés et types de *S. gallinarum*-*S. pullorum*, c'est-à-dire d'abord la dulcité, ensuite le maltose et le xylose. Nous y joignons aussi la mannite, à propos de laquelle, nous avons fait des observations analogues avec une des deux souches mannite-négatives que nous avons isolées dans un même foyer de typhose aviaire.

Rappelons qu'il y a quelques années, Hinshaw et ses collaborateurs [6], réévaluant 300 souches de collection de *S. pullorum* du type américain (xylose 0), qui étaient toutes à l'isolement maltose 0, ont vu qu'un certain nombre d'entre elles, après conservation au laboratoire, donnait un pourcentage variable de subcultures fermentant plus ou moins rapidement ce glucide et que le passage *in vivo* sur dindon de 16 subcultures, provenant d'un exemplaire devenu maltose positif accélérât le processus de fermentation, à l'exception de l'une d'elles redevenue maltose négative comme la souche originelle.

Matériel et méthode. — Nous ne mentionnons ici que les souches qui ont fait l'objet d'une étude approfondie :

Les unes ont été isolées en Iran : n° 18, 515 et 516 : *S. gallinarum* et n° 583 : *S. pullorum*.

Les autres nous ont été aimablement envoyées par le Dr Lucas, de l'Ecole d'Alfort : n° 633 : *S. pullorum* type B de cet auteur et n° 636 : *S. gallinarum* type IV de la même classification [4].

L'action sur les glucides a été recherchée sur milieu à l'eau peptonée, classiquement utilisée pour les *Enterobacteriaceae* et les *Salmonella* en particulier :

Peptone	10 g.
Chlorure de sodium	5 g.
Glucide	10 g.
Eau distillée	1 l.
Bleu de bromothymol sodique à 1/500 Q. S.	
pH : 7,3 à 7,4.	

Le glucide stérilisé par filtration et l'indicateur sont ajoutés après stérilisation du milieu à 110°. L'ensemencement, après contrôle de

stérilité, est pratiqué à partir d'une colonie isolée sur gélose ordinaire inclinée. Les tubes sont capuchonnés et conservés à l'étuve pendant au moins trente jours.

Seul est considéré comme positif le virage au jaune franc, la teinte bleu-vert étant considérée comme négative à l'instar des tubes restés bleus.

Après deux ans de conservation au laboratoire, la vérification des propriétés biochimiques des souches a montré que, pour chacune d'elles, un des quatre glucides énumérés plus haut, et non attaqué au moment de l'isolement, était fermenté par un certain nombre de subcultures dans un délai variable, mais toujours plus ou moins lentement. Par une série d'isolements suivis de repiquages en E. P. glucide, il a été possible d'exalter le pouvoir fermentaire apparu au cours de la conservation et d'obtenir finalement des souches glucide + 1. Après une nouvelle période de conservation d'un an au laboratoire, les caractères biochimiques de la variante obtenue ont été à nouveau vérifiés pour contrôler la stabilité de l'action observée.

Nous n'avons pas essayé de cultiver sur milieu, où le glucide aurait été la seule source de carbone, une souche glucide négative.

Résultats. — 1° Avec les souches de collection nous avons observé les résultats suivants :

Souche 636 : dulcité 0 et xylose 0.

Nous avons obtenu deux variantes :

636/60.	dulcité + 1	xylose 0
636/64.	dulcité 0	xylose + 1,4

Souche 633 : maltose 0.

Elle a donné une variante :

633/38	maltose + 1.
------------------	--------------

N. B. — Signalons à ce propos que, dans la nature, on a isolé tous les intermédiaires entre les souches 0 et + [2, 4, 7].

Souche 18 : xylose 0.

Elle a donné une variante :

18/25	xylose + 4.
-----------------	-------------

Souche 515 : mannite 0.

Elle a donné une variante :

516/17	mannite + 1.
------------------	--------------

Cette souche ainsi que la souche 516, isolées d'un même foyer de typhose aviaire, possédaient la propriété exceptionnelle pour une *Salmonella* de ne pas faire fermenter la mannite (la fermentation du mannitol est classiquement parallèle à celle du glucose, excepté pour *S. typhi suis*). Comme exception, on ne connaît qu'une souche de *S. enteritidis* (Badger) qui n'attaque pas la mannite et *S. banana* qui la fermente lentement (Kauffmann [5]). Mais alors que 515 a présenté des phénomènes de variation, la souche 516 est restée mannite négative.

En résumé les constatations précédentes, ainsi que celles faites par Hinshaw et ses collaborateurs [6], peuvent être condensées dans le tableau I.

TABLEAU I.

<i>Salmonella</i>	DULCITE	MALTOSE	XYLOSE
<i>Pullorum</i> (Hinshaw et coll.) . . .	0	$\begin{smallmatrix} 0 \\ + R \\ \vee \end{smallmatrix}$	0
<i>Pullorum</i> $\left\{ \begin{smallmatrix} 636 \\ 636/60 \end{smallmatrix} \right.$	$\begin{smallmatrix} 0 \\ + 1 \\ \vee \end{smallmatrix}$	+ 1,2	0
<i>Pullorum</i> $\left\{ \begin{smallmatrix} 636 \\ 636/64 \end{smallmatrix} \right.$	0	+ 1,2	$\begin{smallmatrix} 0 \\ + 1,4 \\ \vee \end{smallmatrix}$
<i>Gallinarum</i> $\left\{ \begin{smallmatrix} 633 \\ 633/38 \end{smallmatrix} \right.$	+ 1,2	$\begin{smallmatrix} 0 \\ + 1 \\ \vee \end{smallmatrix}$	+ 1,2
<i>Gallinarum</i> $\left\{ \begin{smallmatrix} 48 \\ 48/23 \end{smallmatrix} \right.$	+ 1	+ 1	$\begin{smallmatrix} 0 \\ + 4 \\ \vee \end{smallmatrix}$
Pour mémoire : <i>gallinarum</i> 515 mannite 0 515/28. mannite + 1 \vee			

La lecture de ce tableau montre tout de suite qu'on peut donc passer par variation de *S. pullorum* (variété américaine) à *S. gallinarum*, autrement dit d'un type :

Dulcité 0 maltose 0 xylose 0.

au type :

Dulcité + maltose + xylose +.

2° Avec une souche étudiée immédiatement après son isolement du poussin, *S. pullorum* 583, nous avons constaté les faits suivants :

Cette souche était au départ maltose-positive lentement (en vingt-six jours). En appliquant dès le premier repiquage la méthode précédente, nous avons obtenu une colonnie attaquant le maltose en six jours. Puis cette propriété s'est peu à peu perdue et finalement nous n'avions plus que des subcultures n'attaquant plus le maltose.

3° Enfin, il semble intéressant d'insister aussi sur la diversité des types isolés au cours d'une même épizootie dans le même foyer : c'est ainsi que lors d'une épizootie qui décima entièrement l'élevage d'Hayderabad, comprenant plus de 3 000 têtes de volailles (jeunes et adultes), nous avons étudié en particulier quinze souches de *S. pullorum* ; or, à côté de souches maltose-négatives nous avons eu des souches attaquant lentement ce glucide, une souche ne produisant pas d' H_2S , une autre attaquant rapidement le citrate...

4° Enfin, il paraît nécessaire de signaler aussi le fait que, avec un grand nombre de souches positives nous avons observé souvent des

différences de un à trois jours dans la positivité : + 1 à + 3, ceci avec des glucides dont l'attaque peut être malgré tout considérée comme relativement stable : maltose, dulcité, xylose, arabinose, tandis qu'avec la sorbite principalement et le rhamnose quelquefois, des différences considérables ont été constatées : + 2 à + 10, + 8 à négatif, + 3 à + 15...

Conclusions. — Il ressort des constatations précédentes :

1° Que pour le groupe *S. gallinarum*-*S. pullorum* des variations considérables peuvent être observées dans les fermentations glucidiques et que l'espèce est mal définie par ses caractères biochimiques. Ceux-ci n'ont d'intérêt que s'ils sont étudiés à l'isolement d'une souche. Il faut cependant faire la réserve que l'on peut observer des variations dans certaines fermentations dès l'isolement.

2° Qu'en raison des variations précédentes et de la diversité des types isolés au cours d'une même épizootie, l'étude biochimique des germes ne peut guère servir à appuyer une enquête épidémiologique, comme c'est le cas pour de nombreuses autres salmonelles.

3° Que s'il peut être commode de conserver les deux types extrêmes *S. gallinarum* et *S. pullorum*, tous les autres types biochimiques intermédiaires décrits ne correspondent pas à une réalité, d'autant que le passage *in vivo*, comme l'a montré Hinshaw, peut aussi accélérer une fermentation comme il peut l'inactiver.

Le diagnostic de l'un ou l'autre type ne pourra parfois être posé que grâce aux caractères morphologiques des cultures (toutefois dans de nombreux types de salmonelles on rencontre des souches donnant des cultures pauvres), sérologiques (dissociation de l'antigène XII), ou à l'action des phages spécifiques.

En résumé cette instabilité dans l'action biochimique est en faveur de l'unicité de l'espèce. D'autre part, des observations de plus en plus fréquentes à l'heure actuelle montrent que volaille adulte ou volaille jeune sont également sensibles aux deux variétés *gallinarum* et *pullorum*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. PACHECO et C. RODRIGUES. *Mém. Inst. Oswaldo Cruz*, 1936, **31**, 591. Bibliographie.
- [2] F. KAUFFMANN. *Zbl. Bakt.*, 1934, **132**, 337.
- [3] L. DELPY et R. RASTEGAR. *Ces Annales*, 1938, **61**, 536. Bibliographie.
- [4] A. LUCAS, L. ANDRAL, G. BOULEY, A. PARAF et C. QUINCHON. *Recueil Méd. Vét. Alfort*, 1951, **127**, 547.
- [5] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*, 2^e éd., Copenhagen, 1954.
- [6] W. HINSHAW, A. BROWNE et T. TAYLOR. *J. inf. Dis.*, 1943, **72**, 197.
- [7] W. HINSHAW, E. MC NEIL et T. TAYLOR. *Poultry Sci.*, 1944, **23**, 94.

ÉTUDES SUR LA TOXINE R₂ DU BACILLE TYPHIQUE.

III. — PRÉPARATION D'UNE TOXINE SOLUBLE

par B. BIZZINI, M. DIGEON et M. RAYNAUD

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

Au cours de recherches effectuées sur la toxine R₂ du bacille typhique [1, 2] (1), nous avons obtenu un produit soluble (P₃), toxique et antigénique. La préparation de ce corps est délicate. Les deux digestions tryptique et phosphatasique suivies d'une déprotéinisation selon Sevag constituent des temps opératoires délicats qui entraînent des pertes parfois considérables de matériel. Si bien qu'il n'était pas possible d'envisager de préparer par cette technique la quantité relativement élevée de toxine purifiée nécessaire à l'étude de ses propriétés. Par ailleurs, le produit P₃, quoique soluble au moment de sa préparation, devenait par conservation, après lyophilisation, de plus en plus difficile à dissoudre. Cette insolubilité, témoin d'une transformation lente du type dénaturation, s'accompagne d'une baisse appréciable de toxicité et rend difficile l'étude immunologique de la toxine.

C'est pourquoi nous avons cherché une autre technique de préparation. Nous avons essayé divers types de dégradation de la toxine brute P₁ (2) [extrait hypertonique dialysé précipité à pH = 4,0 par l'acide acétique]. L'hydrolyse par l'acide acétique N/10 à 60° ou à 100° n'a donné que des fractions peu ou pas toxiques. Il en est de même de l'hydrolyse alcaline à 50° ou à 25°. La seule méthode qui nous ait permis d'obtenir un produit soluble toxique consiste dans l'hydrolyse par l'alcool alcalin à —15° pendant trente minutes.

Technique. — On met en suspension 1 g de P₁ dans 20 ml d'eau distillée. On ajoute de la soude normale jusqu'à obtenir un pH = 12 (il faut en moyenne 1,7 ml de soude normale pour 1 g de P₁). On ajoute 10 g de NaCl : le volume est complété à 100 ml. Le produit P₁ se dissout presque entièrement à ce pH. On refroidit à 0° et on centrifuge à grande vitesse pour éliminer le petit résidu insoluble. Le liquide surnageant est refroidi à —8°. On ajoute alors 200 ml d'éthanol refroidi préalablement à —15°. On laisse trente minutes à —8°—10°. Un précipité abondant apparaît, que l'on recueille par centrifugation à —8°. Après dissolution dans l'eau distillée et dialyse à 0° pendant douze à vingt-quatre heures, on lyophilise. Le produit obtenu constitue la toxine soluble « a ». Le surnageant de la préci-

(1) Ce mémoire est le troisième d'une série dont les deux premiers éléments sont représentés par les publications [1] et [2].

(2) Il y a intérêt à préparer cette toxine brute P₁ à partir de germes frais, les résultats étant plus réguliers qu'à partir de germes desséchés par l'acétone ou par lyophilisation.

pitation ne contient pas de produit toxique. Le précipité « a » contient 70 à 80 p. 100 de la toxicité initiale. Il se dissout très facilement dans l'eau en donnant une solution opalescente (solubilité maxima 10 à 12 mg par millilitre). Les réactions colorées suivantes sont positives :

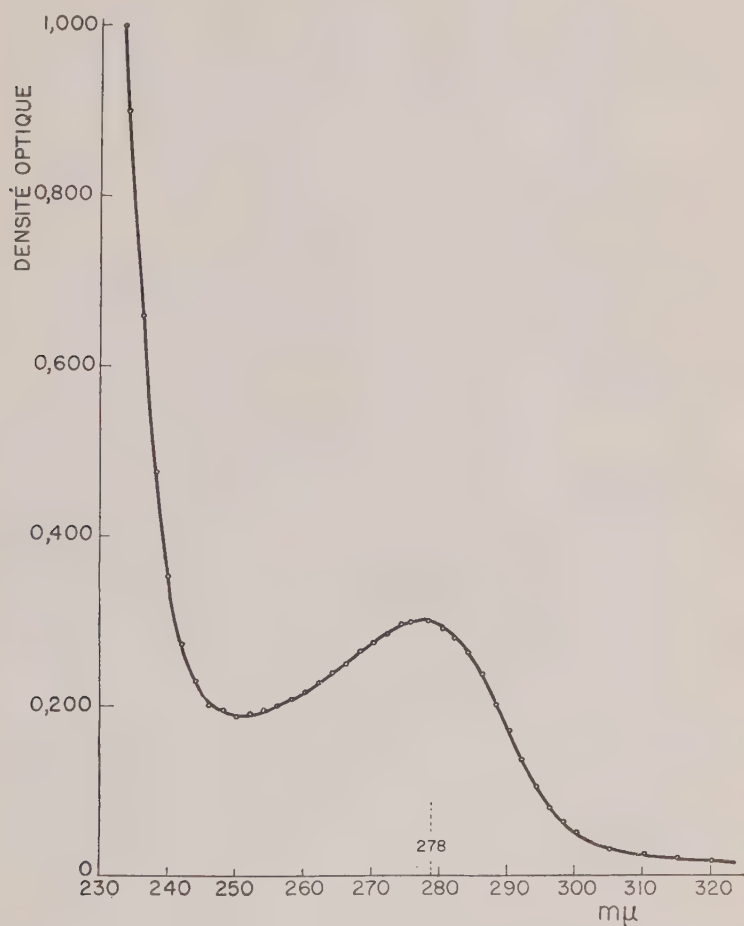


FIG. 1.

Biuret, Xanthoprotéique, Ninhydrine, Sakaguchi, Hopkins-Cole, Millon, Dische à la diphénylamine, Mejbaum.

Le spectre ultra-violet d'une préparation est reproduit sur la figure 1.

La composition chimique se trouve indiquée aux tableaux I et II. La toxine soluble « a » se conserve bien à basse température sous forme lyophilisée. Au bout de six mois, la toxicité diminue légèrement mais le produit reste parfaitement soluble dans l'eau.

Discussion. Résumé. — Les résultats des analyses rapportés aux tableaux I et II montrent que la toxine « a » est encore un produit complexe. Les tests immunologiques d'homogénéité (précipitation spé-

TABLEAU I.

Préparation N°	Toxicité	N Kjeldahl	P	Glucides	Pentoses	Cendres	Rendement**	
							Poids	Toxicité
8000 P ₁	0,8	10,1	1	13,5	—	19,4	100	100
a	0,35	8,6	0,51	23,0	—	12,5	30 %	63 %
8032 P ₁	0,50	9,08	1,78	12,96	1,62			
a	0,25	7,26	1,67	13,42	1,81	17,35	74 %	148 %
8050 P ₁	0,25	8,76	1,80	12,70	1,80			
a	0,15	7,19	1,87	13,90	1,77	14,45	72 %	119 %

TABLEAU II.

Préparation N°	C	H	N		Cendres
			Dumas	Kjeldahl	
a.8003	40,5	5,9	10,85	11,12	16,24
a.8032	40,91	6,7	7,63	7,26	17,35
a.8050	41,45	7,13	7,58	7,19	14,45

* D.M.M. Dose (en mg) tuant 100 p. 100 des souris (20 g) en quatre jours après injection intra-péritonéale. Les autres résultats sont exprimés en p. 100 du poids sec.

** Le rendement est exprimé en p. 100 par rapport à P₁.

cifique en gel) révèlent dans la préparation, au moins quatre constituants distincts. La solubilité de ce produit et sa bonne conservation rendent possible cependant l'étude de ses propriétés biologiques, qui feront l'objet d'une publication ultérieure. L'absence d'homogénéité ne permet cependant pas de tirer de conclusion définitive sur la nature chimique réelle de la toxine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. RAYNAUD et M. DIGEON. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 564.
- [2] M. DIGEON, M. RAYNAUD, A. TURPIN. *Ces Annales*, 1952, **82**, 206.

**RECHERCHES SUR L'ACTIVITÉ
ANTIBIOTIQUE ET « PROBIOTIQUE »
DE DIVERSES CORYNÉBACTÉRIES NON PATHOGÈNES
A L'ÉGARD DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE***

G. TERRASSE et R. SÖHIER.

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

Dans deux notes publiées en 1949, J. Thibaut [1, 2] attira l'attention sur l'activité antibiotique intraspécifique de diverses espèces de corynébactéries. Il nous a paru intéressant d'examiner notre collection afin de déceler les souches de corynébactéries non pathogènes susceptibles d'inhiber la croissance de *C. diphtheriae* et d'essayer d'évaluer l'importance des perturbations que peuvent apporter ces espèces au diagnostic bactériologique de la diphtérie.

MATÉRIEL. — Les souches testées se répartissent de la façon suivante : 36 souches de bacilles diphtéroïdes ont été mises en présence de 23 souches de *C. diphtheriae*. Parmi les premières, 2 nous ont été envoyées par J. Thibaut (1) [souches V62 et HA10], 8 ont été isolées en Belgique par M. Welsch et sont conservées dans ce laboratoire depuis plusieurs années, 3 souches font partie de la collection de l'Institut Pasteur de Paris ; enfin, 23 souches ont été isolées dans ce laboratoire ; soit au total : 13 souches de type H, 3 de type V, 2 de type X, 13 de type Y et 5 de type Z (d'après la classification de M. Welsh). Sur les 23 souches de *C. diphtheriae*, 19 ont été isolées à Lyon, 2 nous ont été envoyées par J. Thibaut, 1 fait partie de la collection de l'Institut Pasteur de Paris et 1 de la collection du Laboratoire Central d'Hygiène du Ministère de la Santé Publique de Bruxelles.

MÉTHODE. — Après de nombreux essais inspirés des techniques de J. Thibaut, nous nous sommes arrêtés à la technique ci-dessous qui nous a donné les inhibitions maximum.

Nous avons utilisé le milieu dit « 107 » ayant la formule de celui donné par DIFCO, mais dans lequel la protéose peptone n° 3 a été remplacée par une peptone IFFA, soit : peptone, 20 g ; glucose, 2 g ; ClNa, 5 g ; agar, 20 g ; eau distillée, 1 000 ml. Stérilisation à 110° pendant dix minutes. Pour enrichir ce milieu, on ajoute une solution à 5 p. 100 d'hémoglobine (sang laqué) de mouton ou de cheval, à raison de 10 p. 100 du milieu de base. Le mélange se fait stérile-

(1) Nous remercions vivement le Dr J. Thibaut, Service de Bactériologie de l'Institut Ernest-Malvoz, de Liège, d'avoir bien voulu nous adresser, à titre de référence, plusieurs des souches qu'il avait isolées et testées.

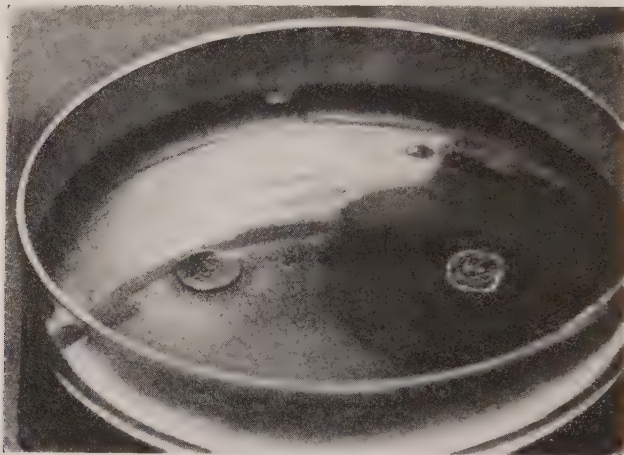


FIG. 1. — Exemple d'inhibition de *C. diphtheriae miti* (souche 1) par une corynébactérie non pathogène (souche V 62) à droite. A gauche, aucun pouvoir antibiotique chez une corynébactérie différente. Aspect après quinze heures à 57°.

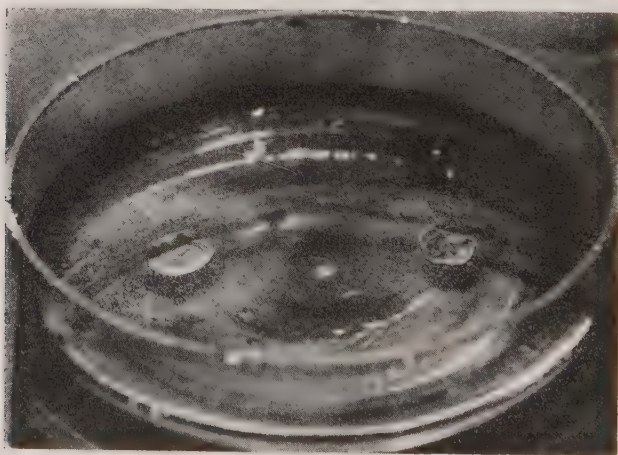


FIG. 2. — Les deux souches de corynébactéries non pathogènes (souche DW3 à gauche et souche 11T à droite) ont favorisé la croissance de *C. diphtheriae intermedius* (souche D). Aspect après quinze heures à 37°.

ment à 60°, puis le milieu est maintenu à 75° pendant quinze à vingt minutes et coulé.

Les souches de bacilles diphtéroïdes sont cultivées pendant vingt-quatre heures sur milieu 107 enrichi. Cette culture est ensuite ensémencée à l'öse sur des boîtes de Petri (diamètre : 10 cm) contenant 20 ml de milieu 107 simple, sous forme de pastilles d'environ 8 mm de diamètre (voir fig. 1 et 2). Après quarante-huit heures à 37°, ces cultures sont stérilisées aux vapeurs de chloroforme par une exposition de deux heures et demie à trois heures. Les boîtes sont alors inondées avec une suspension de *C. diphtheriae* en eau physiologique (ClNa à 9 p. 1 000) obtenue à partir d'une culture de vingt-quatre heures sur milieu 107 enrichi, et dont l'opacité est évaluée par comparaison avec une suspension de bacilles typhiques à 1 milliard de germes au millilitre. La lecture se fait après vingt-quatre heures à 37° ou même quarante-huit heures selon la vitesse de pousse du germe. Les souches inhibitrices s'entourent d'une zone annulaire demeurée stérile, alors que le reste de la boîte s'est couvert de colonies confluentes ou séparées selon la souche (fig. 1). La sensibilité de *C. diphtheriae* est évaluée par le rayon de la couronne d'inhibition mesuré en millimètre.

RÉSULTATS. — 1° *Fréquence du phénomène d'antibiotisme.* — Sur les 36 souches de bacilles diphtéroïdes examinées, il faut faire abstraction de la souche V62, de type V, qui nous a servi de référence et nous a donné les plus fortes inhibitions observées. Cette souche se comporte d'ailleurs assez différemment des 2 souches suivantes, en particulier vis-à-vis de *C. diphtheriae mitis*. Sur les 35 souches restant, 2 sont apparues douées d'un pouvoir antibiotique notable : souches étiquetées, dans notre collection, Xnez (type Y) et 11 T (type Z). Le détail des résultats est résumé dans la figure 3. Onze autres souches ont révélé une action antibiotique nettement plus réduite et plus limitée, ne donnant qu'une « zone fantôme » en présence de 2 ou 3 souches de *C. diphtheriae*. Ce sont : 3 souches de type H (2 *C. pseudodiphthericum* et 1 *C. fermentans*), 1 de type V, 1 de type X, 5 de type Y et 1 de type Z.

C. diphtheriae de type *mitis* est nettement plus sensible que les types *gravis* et *intermedius*.

2° *Influence du milieu de culture sur ce phénomène.* — Nous avons abandonné, au début de nos essais, la gélose nutritive simple qu'utilisait J. Thibaut, car elle ne donnait trop souvent qu'une végétation nulle ou trop réduite du bacille diphtérique, particulièrement pour les *intermedius*. Nous avons remarqué des différences considérables entre les résultats obtenus sur milieu 107 simple et sur milieu 107 enrichi d'une part, et d'autre part selon que la culture était ou non stérilisée aux vapeurs de chloroforme.

L'adjonction de sang laqué diminue notablement l'activité antibiotique. On peut se demander si le facteur d'inhibition n'est pas contrebalancé par l'action favorisante de l'hémoglobine. La stérilisation au chloroforme augmente l'importance de l'antibiotisme. Nous n'avons cependant pas observé une action néfaste du chloroforme sur *C. diphtheriae* se traduisant par une diminution de pousse du germe.

La peptone incorporée au milieu exerce aussi une influence certaine sur cette activité antibiotique. La protéose peptone n° 3 de Difco, par exemple, donne des résultats différents de la peptone IFFA que nous avons régulièrement utilisée (2) et qui permettait une croissance plus importante des différents types de *C. diphtheriae*.

3° Mise en évidence d'une activité « probiotique » de certaines

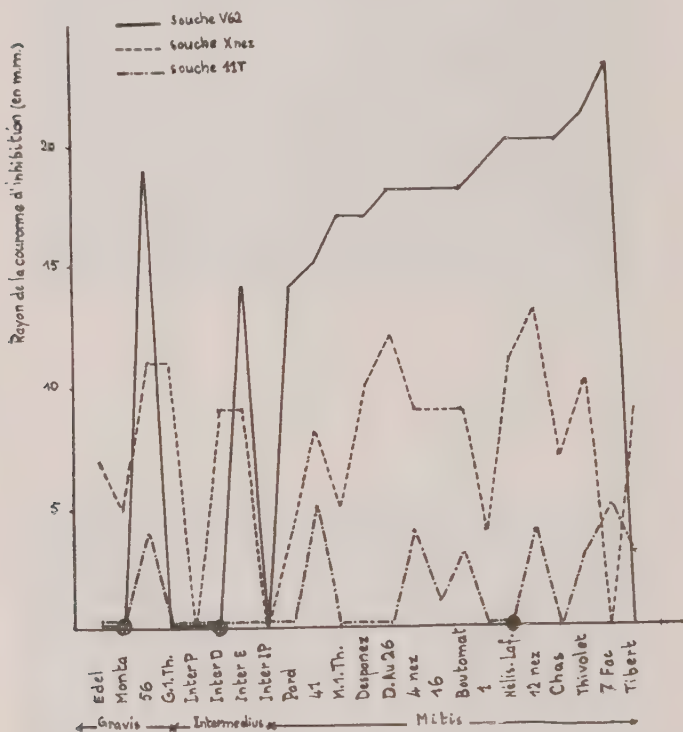


FIG. 3. — Les cercles hachurés indiquent les souches de *C. diphtheriae* ayant donné une pousse accrue avec la souche 41T. On remarque la plus grande sensibilité des *mitis*, et le comportement assez différent de la souche V62 par rapport aux deux autres bacilles diphtéroïdes.

souches de bacilles diphtéroïdes. — Sur les 36 souches examinées, 9 ont paru accroître remarquablement la pousse de *C. diphtheriae* et 7 autres souches ont montré une activité « probiotique » beaucoup plus réduite et limitée à 1 ou 2 souches de *C. diphtheriae*. Cette activité se traduit, sur les boîtes de Petri ensemencées selon la technique

(2) Il s'agit d'une peptone de viande préparée selon un procédé non publié. Nous avons utilisé, pour la majeure partie de ce travail, le milieu 107 desséché par atomisation.

décrite ci-dessus, par une zone annulaire autour de la pastille de bacille diphtéroïde où *C. diphtheriae* montre des colonies grosses et confluentes, alors que le reste de la boîte présente des colonies fines et distinctes. Cette couronne de végétation accrue apparaît très souvent au bout de quinze à dix-huit heures à 37° alors que la surface de la boîte est demeurée stérile et ne se couvrira de colonies qu'au bout de vingt-quatre à trente-six heures d'étuve (fig. 2). Le rayon de cette couronne peut aller jusqu'à 12-14 mm. Une même souche, par exemple la souche 11T citée plus haut, peut donner lieu à une inhibition avec certaines souches de *C. diphtheriae* et jouer comme facteur favorisant à l'égard de certaines autres (fig. 3).

Nous avons cherché à préciser ce phénomène. Une souche, remarquable par son activité « probiotique », est cultivée pendant quarante-huit heures en bouillon. La culture est filtrée sur membrane Zeiss. Ce filtrat est incorporé à raison de 30 p. 100 à une gélose nutritive maintenue en surfusion vers 50°. Ce milieu favorise nettement la croissance de certaines souches de *C. diphtheriae* par comparaison avec une gélose nutritive ordinaire. Cependant, il s'agit là d'un phénomène complexe dont l'étude doit être poursuivie.

4° *Parallélisme entre l'activité antibiotique de « diphtheroïdes » et celle des antibiotiques utilisés en thérapeutique.* — Nous avons mesuré la sensibilité aux antibiotiques des souches de *C. diphtheriae* étudiées. Une comparaison intéressante peut être établie entre l'antibiotisme intra-spécifique et la réaction de *C. diphtheriae* aux antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique. Cette étude fera l'objet d'une note à paraître.

RÉSUMÉ. — 1° Nous avons examiné le pouvoir antibiotique de 36 souches de corynébactéries non pathogènes à l'égard de 23 souches de *C. diphtheriae* groupant les trois types *gravis*, *intermedius* et *mitis*. Si l'on excepte une souche de référence, deux représentants des bacilles diphtéroïdes (1 *C. minutissimum* et 1 *C. xerose*) ont révélé un pouvoir inhibiteur remarquable, notamment pour *C. diphtheriae* de type *mitis*. Cet antibiotisme intra-spécifique varie selon les conditions de l'expérience, en particulier avec le milieu de culture utilisé.

2° Nous avons mis en évidence l'action « probiotique » de 9 souches de bacilles diphtéroïdes envers les 23 souches de *C. diphtheriae*. L'étude de ce phénomène doit être poursuivie.

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. THIBAUT. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1150 et 1287.

ISOLEMENT DE MYCOBACTERIES NON PATHOGENES PAR CULTURE DE L'EXPECTORATION DES TUBERCULEUX PULMONAIRES. LEURS CARACTERES DISTINCTIFS

par J. VIALIER.

(Institut Pasteur de Lyon.)

Nous avons isolé, par culture de l'expectoration de sujets chez lesquels le diagnostic de tuberculose pulmonaire ne faisait cliniquement aucun doute, 26 souches de mycobactéries non pathogènes. Trois fois cette mycobactérie était associée à un *Mycobacterium tuberculosis* authentique. C'est sur les caractères distinctifs de ces saprophytes acido-alcoolo-résistants qui, à première vue, peuvent être confondus avec des bacilles tuberculeux, que nous voudrions insister.

Ces souches provenaient de 22 liquides de tubages gastriques et de 4 expectorations émises par les malades. Dans aucun cas l'examen du produit pathologique coloré par le Ziehl classique n'avait mis en évidence de bacilles acido-alcoolo-résistants. Il n'y avait donc à l'origine qu'un nombre très restreint de mycobactéries et la culture sur milieu de Löwenstein ne donna naissance parfois qu'à une seule, toujours qu'à un petit nombre de colonies qui au quarante-cinquième jour restaient isolées, nettement distinctes les unes des autres.

Le diagnostic des mycobactéries non pathogènes est facile lorsqu'elles sécrètent un pigment abondant. Huit souches isolées étaient nettement chromogènes, les colonies colorées en jaune foncé ou en rouge et l'apparition de la pigmentation précoce. Pour les 18 autres l'identification fut plus délicate, les colonies non chromogènes apparaissaient sur la surface du milieu, petites, isolées, sans tendance à l'extension, assez plates, sans pourtant reproduire l'aspect verruqueux, sec, à surface plissée ou mamelonnée des cultures du bacille tuberculeux virulent. Ces colonies avaient été considérées avant la détermination de la sensibilité aux antibiotiques, comme celles de bacilles tuberculeux.

Morphologiquement, si on note un certain polymorphisme : mélange de formes longues ou courtes, renflées ou rectilignes, l'acido-alcoolo-résistance, la sulfito-résistance furent des caractères insuffisants pour permettre une identification valable. Beaucoup plus importante fut pour nous la disposition des bacilles à l'intérieur des colonies poussées en milieux liquides additionnés de sérum sanguin. Les bacilles virulents apparaissent alors en « longs faisceaux constitués par des amas disposés parallèlement et formant des arabesques que les auteurs américains décrivent sous le nom de « formations serpentine » [1]. Au contraire, nos 26 souches avirulentes, dépourvues de « cord-factor » [2], poussèrent en donnant des amas informes plus ou moins

volumineux. En milieu liquide de Youmans sérum de cheval, les cultures apparaissaient sinon homogènes, du moins en grains très fins et différaient toujours de l'aspect en amas des souches virulentes.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries ainsi isolées nous a toujours paru d'une extrême importance. La majorité de nos souches étaient sensibles à la streptomycine à une concentration inférieure à 10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Très rarement il fallait 50 μg pour inhiber toute croissance. Ces résultats sont conformes à ceux de P. Hauduroy et W. Rosset [3].

Les 26 souches se développaient normalement, malgré une concentration en PAS du milieu de culture de 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. La sensibilité au PAS des bacilles paratuberculeux a fait l'objet des travaux de G. Penso [4] et A. Lutz [5]. Pratiquement l'acide para-amino-salicylique n'a pas d'effet bactériostatique sur la croissance des bacilles paratuberculeux, ce qui les différencie des bacilles tuberculeux et en particulier des souches qui ont perdu leur virulence.

Aucune des 26 souches n'était sensible à une concentration d'isoniazide de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Si le bacille de Koch est extrêmement sensible à cet antibiotique, les paratuberculeux sont spontanément résistants [6, 7, 8, 9]. Nous pensons que l'insensibilité à l'isoniazide d'une mycobactérie poussant en grains très fins en milieu liquide de Youmans, doit toujours faire suspecter sa valeur pathogène. Si nous insistons sur cette iso-résistance, ce n'est pas que nous discutions la valeur du test de l'insensibilité au PAS, c'est parce qu'en pratique courante, la sensibilité à l'isoniazide est toujours recherchée, celle au PAS plus rarement. Au cours de nos essais de sensibilité, toute souche offrant les trois caractères suivants : culture en milieu de Youmans sérum de cheval homogène ou en grains très fins, absence microscopique de formations serpentines, insensibilité à l'isoniazide, est identifiée plus complètement. Nous connaissons bien, à l'heure actuelle, la fréquence avec laquelle on isole des souches de bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide, parfois même chez des sujets non encore traités. Certaines de ces souches peuvent avoir perdu en partie ou presque totalement leur virulence ; leurs caractères cultureux sont alors différents de ceux des mycobactéries non pathogènes.

Nous avons systématiquement recherché, pour chacune des 26 souches, un test de virulence cytochimique, en l'espèce la coloration par le rouge neutre [10] : toutes présentèrent une réaction négative. Au contraire, une réaction positive pour deux souches à caractères cultureux anormaux, isolées durant la même période, nous les fit considérer comme virulentes. Elles tuberculisèrent le cobaye. Lorsque la mycobactérie isolée sécrète un abondant pigment rouge, la lecture est parfois délicate. On hésite, en effet, pour savoir si le rouge neutre a coloré les bacilles ou s'il s'agit de leur teinte originelle. Par comparaison avec les bacilles non colorés, nous pensons que cette cause d'erreur peut être évitée. Un test cytochimique de virulence, utilisant des colorants différents, peut être appliqué [11].

Par définition même, les mycobactéries non pathogènes sont incapables de créer chez l'animal une tuberculose expérimentale, d'évolution progressive, avec des lésions spécifiques histologiquement définies et réinoculables d'animal malade à animal sain. Dans un certain

nombre de cas, le produit pathologique à l'origine de la mycobactérie fut inoculé au cobaye. D'autre part, 11 souches isolées furent injectées, enrobées d'huile de vaseline, dans la cavité péritonéale du cobaye, à la dose de 1 mg. Deux fois le cobaye mourut au quinzième ou dix-huitième jour, les autres furent sacrifiées après le quarante-cinquième jour. Dans trois cas, dont les deux morts précoces, l'autopsie montra des lésions minimales : fausses membranes, taches de bougie au niveau de l'épiploon, de la rate et du foie, avec bacilles acido-alcoolorésistants décelables à leur niveau. Pour tous les autres animaux, qu'il se soit agi de l'inoculation directe du produit ou de la souche isolée, l'autopsie resta entièrement négative, sans aucune lésion de tuberculose expérimentale. Si l'absence de virulence pour le cobaye d'une mycobactérie isolée d'une expectoration ou d'un liquide de tubage constitue, par définition même, le caractère distinctif fondamental des mycobactéries non pathogènes, la question s'est compliquée actuellement. Les bacilles devenus iso-résistants ont, pour beaucoup d'auteurs [42, 43], perdu une grande partie de leur virulence pour le cobaye. Depuis quelques années nous assistons du reste à des modifications considérables dans les résultats fournis par l'inoculation directe au cobaye de produits pathologiques. Les lésions à l'autopsie, au cinquantième jour, sont minimales : nodule au point d'inoculation, ganglion inguinal et lombaire sans propagation à la rate et aux autres viscères. Pour Jensen, la distinction entre mycobactéries tuberculeuses devenues iso-résistantes, et saprophytes spontanément iso-résistantes ne peut être affirmée que si l'inoculation au cobaye est faite à la dose de 1 mg de culture pure. L'emploi de telles doses ne nous a jamais laissé de doute sur la nature de la souche.

A trois reprises enfin, nous avons isolé deux mycobactéries pathogène et saprophyte, à partir du même produit pathologique (deux liquides de tubage gastrique, une expectoration). Dans deux de ces cas, il n'y avait pas de bacilles à l'examen direct, mais l'inoculation au cobaye, positive, aurait pu donner à penser que les colonies, non chromogènes, isolées sur milieu solide, correspondaient bien à d'authentiques bacilles tuberculeux [44]. Au cours des repiquages ultérieurs, la mise en évidence des caractéristiques énoncées précédemment, nous fit admettre que la souche isolée par culture correspondait à un mélange où prédominait la mycobactérie iso-résistante, non pathogène pour le cobaye. La possibilité de l'existence de tels mélanges, quoique rare, doit être bien connue car elle peut apporter une cause d'erreur extrêmement importante et lourde de conséquences dans la recherche de la sensibilité aux antibiotiques d'une souche pathogène isolée [45].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DUMAS. *Bactériologie médicale*. Flammarion, édit.
- [2] H. BLOCH. *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 197.
- [3] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *Ces Annales*, 1948, **74**, 39.
- [4] G. PENSO in *Bacilles tuberculeux et paratuberculeux*. Masson, édit., 1950, p. 99.
- [5] A. LUTZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1404.
- [6] J. BRUN et J. VIALIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1332.

- [7] R. LINZ et E. LECOQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1444.
 [8] G. BRAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 345.
 [9] A. LUTZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1369.
 [10] J. VIALIER et J. TIGAUD. *Ces Annales*, 1953, **85**, 746.
 [11] J. DESBORDES et E. FOURNIER. *Rev. Immunol.*, 1954, **18**, 56.
 [12] D. MITCHISON. *Brit. med. J.*, 1954, n° 4854, 128.
 [13] N. RIST, F. GRUMBACH et C. LIBERMANN. *Gazette méd. Fr.*, 1954, **61**, 191.
 [14] J. VIALIER et A. BERTOYE. *Ces Annales*, 1954, **86**, 376.
 [15] P. HAUDUROY. *Presse méd.*, 1953, **61**, 1670.

NOUVEAU PROCÉDÉ D'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX DANS LES CRACHATS. USAGE DU TEEPOL DILUÉ

par F. TISON.

(*Sanatorium de Praz-Coutant, Haute-Savoie.*)

Dans une note récente [4], nous avons étudié la possibilité d'isoler le bacille de Koch à l'aide de corps tensio-actifs. L'écueil se trouvait dans la difficulté de séparer ensuite le culot de centrifugation du résidu du mouillant utilisé. La dilution ou le lavage se révélaient difficiles. Les méthodes compliquées utilisant des procédés physiques ou diastasiques furent décevantes.

Nous avons eu, alors, l'idée de diluer le mouillant à l'avance. Mais le teepol, en solution aqueuse, ne donnait pas une fluidification suffisante des crachats recueillis directement ou par lavage gastrique.

Il a fallu l'utiliser en solution légèrement alcaline.

a) *Teepol à 10 p. 100.* — La solution utilisée comprenait 10 p. 100 de teepol et 1 p. 100 de soude. Le temps de contact-agitation était de une demi-heure.

La comparaison avec notre méthode à la soude à 4 p. 100 porta sur 30 produits et sur 240 tubes ensemencés. Mais l'homogénéisation n'était pas satisfaisante et la végétation du bacille de Koch en souffrait.

b) *Teepol à 25 p. 100.* — Nous avons alors essayé la technique suivante :

Technique :

A 2 cm³ de crachats, ajouter 4 cm³ de la solution suivante :

Teepol	25 cm ³ .
Soude technique pure	1 g.
Eau.	Q.S.P. 100 cm ³ .

Verser dans un grand tube à centrifuger conique stérile.

Agiter trente minutes à température du laboratoire.

Neutraliser alors en diluant avec la solution stérile :

SO ₄ H ₂ pur	0,90 cm ³
Eau distillée	1 000

Pourpre de bromocrésol, trace teinte jaunâtre.

Jusqu'à apparition de nuages jaunes au sein de la couleur bleue obtenue (ne pas attendre le virage total au jaune).

Centrifuger une heure à 3 000 tours et ensemercer le culot sur six tubes de Jensen frais [2].

Résultats. — Pour une comparaison valable nous avons procédé au partage des crachats (généralement négatifs aux procédés optiques).

Une moitié étaitensemencée sur quatre tubes après traitement à la soude [3].

Une moitié était traitée selon la technique ci-dessus etensemencée sur quatre tubes de la même série de fabrication.

La comparaison porte sur 96 produits, donc sur 768 tubes.

POSITIFS APRÈS TRAITEMENT
A LA SOUDE

—
16

POSITIFS APRÈS TRAITEMENT
AU TEEPOL A 25 °/

—
27

Mais la rapidité d'apparition des colonies par la méthode au teepol est tout à fait remarquable. Il est fréquent de constater l'apparition de colonies bien visibles dès le douzième ou quinzième jour.

Si on note arbitrairement :

1° Les tubes avec rares colonies.

2° Les tubes avec quelques colonies.

3° Les tubes avec nombreuses colonies.

4° Les tubes avec très nombreuses colonies.

On peut attribuer un coefficient approximatif à la végétation par l'une ou l'autre méthode de culture.

NOTE POUR LA MÉTHODE
A LA SOUDE

—
76

NOTE POUR LA MÉTHODE
AU TEEPOL A 25 P. 100

—
202

Comme on le constate, cette méthode est simple et satisfaisante. Elle est, certes, susceptible de perfectionnements. Dès maintenant, dès que la quantité de produit est suffisante, nous ensemençons par les deux méthodes en parallèles.

Plusieurs centaines de comparaisons sont en cours, concernant des crachats, des pus, des urines, etc.

BIBLIOGRAPHIE

[1] F. TISON et A. LOZE. *Ces Annales*, 1954, **87**, 445.

[2] F. TISON. *Rev. Tuberc.*, 1953, **17**, 943.

[3] F. TISON. *Ces Annales*, 1951, **80**, 639.

RECHERCHES SUR LE DIAGNOSTIC ALLERGIQUE DE LA LYMPHANGITE ÉPIZOOTIQUE DU CHEVAL PAR L'HISTOPLASMINE

par Ph. HILSONT et J. VERGE.

(Laboratoire de Bactériologie, Ecole Vétérinaire, Alfort.)

La parenté qui, selon certains auteurs, existerait entre *Histoplasma capsulatum* et *Cryptococcus farciminosus* nous a incités à utiliser l'histoplasmine (extrait filtré et stérile de cultures d'*H. capsulatum* en milieu synthétique à base d'asparagine) pour le diagnostic clinique de la lymphangite épizootique des équidés.

Nos recherches ont été réalisées à Bamako (A. O. F.), étant donné le caractère exceptionnel de la cryptococcose équine en France à l'heure actuelle. Les animaux cliniquement infectés subissaient un contrôle microscopique et l'on s'attachait à déceler l'élément spécifique par examen du pus entre lame et lamelle et mise en évidence du cryptococque, facilement reconnaissable à sa forme, à ses extrémités en citron et surtout à sa membrane d'enveloppe à double contour.

L'histoplasmine concentrée a été, pour l'usage, diluée à 1/10 au moyen de sérum physiologique et injectée par voie intradermique au niveau de la paupière inférieure, réalisant ainsi une technique absolument identique à l'épreuve palpébrale pour la détection de la morve.

La lecture des résultats a eu lieu quarante-huit heures après la sollicitation allergique. La réaction positive aurait dû se traduire, supposons-nous, par un œdème cutané plus ou moins marqué au niveau de l'injection, par une induration persistante et sensible du territoire interrogé ainsi que par des manifestations de conjonctivite muco-purulente plus ou moins étendue.

Nous avons utilisé tout d'abord, en Afrique comme en France, l'histoplasmine chez de nombreux chevaux sains, étalons ou juments, bien connus de nous et exempts de tous signes de lymphangite spécifique. Aucune réaction n'est apparue dans les heures qui suivirent le test palpébral.

Nous avons utilisé ensuite l'histoplasmine chez six chevaux et un mulet présentant des symptômes incontestés de lymphangite cryptococcique au niveau du thorax ou des membres, avec ulcérations riches en parasites.

Dans quelques cas, la réaction fut marquée, après vingt-quatre heures, par un bourrelet léger réduisant à peine la fente palpébrale et montrant une sensibilité minime à la palpation. Les signes tendaient rapidement à disparaître ; de plus, l'œil n'a manifesté à aucun moment de tendance, ni au larmolement, ni à la suppuration.

Conclusions. — Dans les conditions de nos essais, l'histoplasmine, extrait stérile de cultures filtrées d'*Histoplasma capsulatum*, ne saurait

être utilisée avec succès dans le diagnostic allergique de la lymphangite épizootique des équidés, malgré la parenté qui semble unir *Histoplasma capsulatum* et *Cryptococcus farciminosus*.

UN CAS DE CHARBON BACTÉRIDIEEN CHEZ LE CHIEN

par L. ANDRAL et CH. SÉRIÉ.

(Institut Pasteur d'Addis-Abeba [Ethiopie].)

Le 20 février 1953, un chien de race commune est apporté dans le coma à notre consultation vétérinaire, où il succombera dix minutes plus tard.

Anamnèse. — Les premiers symptômes auraient été constatés environ trois heures avant la mort : l'animal, de plus en plus fatigué, ne peut rester debout ; il s'affaisse ; ses membres sont animés de mouvements incoordonnés.

Examen. — Les muqueuses sont congestionnées, légèrement cyanotiques ; le poulx est filant ; les pupilles dilatées. On note de l'hypothermie.

Diagnostic clinique. — Syndrome d'intoxication ?

Autopsie. — Piqueté hémorragique réparti sur le péritoine, le mésentère, le myocarde. La rate est doublée de volume, diffluyente. Le sang est noir, ne coagule pas.

Laboratoire. — 1° La réaction de précipitation d'Ascoli est positive.

2° On colore des frottis de pulpe splénique qui montrent des bâtonnets prenant le Gram.

3° Des ensemencements de la rate, du sang du cœur, de la moelle osseuse donnent naissance à des cultures pures de *Bacteridium anthracis*.

4° L'inoculation au cobaye confirme cette identification.

CONCLUSION. — a) Nous rapportons l'observation d'un cas de charbon bactéridien à forme septicémique suraiguë, ayant entraîné la mort d'un chien.

b) Les lésions constatées à l'autopsie et les examens de laboratoire ont permis de porter un diagnostic que la clinique aurait *a priori* écarté, étant donné la rareté de l'infection bactériidienne chez cette espèce animale.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Recherches sur le pouvoir anti-complémentaire de l'Euglobuline I₁ de Sandor, par R. VARGUES et M^{lle} S. LABROSSE.

Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque de l'œuf embryonné. III. Action favorisante du carbonate de magnésium, par B. FAUCONNIER.

Variantes biochimiques de *S. miami* et *S. sendai*. Etude de l'antigène a, par L. LE MINOR.

Notes sur quelques propriétés des toxines engendrées par différents types de *Cl. botulinum*, par M^{lles} M. GUILLAUMIE, A. KREGUER et A. GEOFFROY.

La culture des Mycobactéries sur gélose nutritive. Son intérêt relatif pour différencier les bacilles tuberculeux et paratuberculeux, par H. BOISVERT.

Etude sur la transmission expérimentale de la myxomatose au lièvre, par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

LIVRES REÇUS

L'enfance mentalement insuffisante. Rapport d'un comité mixte d'experts réuni par l'OMS, avec la participation des Nations Unies, de l'OIT et de l'UNESCO. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 75, 52 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1,- -, 1 s. 9 d., ou \$ 0,25 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).

Symposium on abnormal and pathological plant growth. 1 vol. 303 p., Office of technical Services, Department of Commerce, Washington 25 (U. S. A.), édit., 1954. Prix : \$ 2,10.

Ce volume contient les communications qui ont été présentées au VI^e des Symposiums qui se tiennent annuellement à Lipton, sous le patronage du Brookhaven National Laboratory. Celui-ci a eu lieu du 3 au 6 août 1953. Toutes les notes que contient le volume sont abondamment illustrées et sont accompagnées des discussions qui les ont suivies.

H. T.

F. C. O. Valentine et R. A. Shooter. — *Recent advances in chemotherapy.* III. *Antibiotics.* 1 vol. 292 p., J. et A. Churchill, Londres, édit., 1954. Prix : 26 s. 6 d.

Cet ouvrage est un tableau de l'état actuel de la question. Il étudie les divers antibiotiques, depuis les plus anciennement découverts (pénicilline) jusqu'aux plus récents (érythromycine, magnamycine, etc.) et leurs indications dans les diverses infections : infections à staphylo-

coques, à streptocoques, endocardite, tuberculose, méningite, actinomyose, tétanos, infections intestinales, vénériennes, et enfin infections provoquées par les rickettsies ou certains gros virus. L'accent est mis sur la résistance acquise plus ou moins rapidement par les divers germes et qui limite singulièrement l'efficacité des antibiotiques.

H. T.

R. F. Bridgman. — *L'hôpital rural. Sa structure et son organisation. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Monographies, n° 21, 160 p. Prix : Fr. s. 8, Fr. fr. 640, 10 s. 0 d., \$ 2,00 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).*

Organisation Mondiale de la Santé. — *Soins infirmiers, aperçu de législation sanitaire comparée. Recueil international de Législation sanitaire, 1953, 4, 483-522. Prix : Fr. s. 1, 2 s. 0 d., \$ 0,25 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).*

Bibliographie de Dictionnaires scientifiques et techniques multilingues. 1 vol., 178 p., UNESCO, 19, avenue Kléber, édit., 1953. Prix : 500 fr.

Il s'agit d'une liste de dictionnaires bilingues ou polyglottes concernant les différents domaines de la science et de la technique, qui a été établie par les soins de l'UNESCO. Les dictionnaires sont classés par rubriques selon le système de la classification décimale universelle, conçue pour le classement des livres sur les rayons des bibliothèques. La notation adoptée permet d'exprimer les rubriques avec concision et d'indiquer sans équivoque possible l'ordre dans lequel elles se succèdent. Tous les symboles utilisés en outre dans le volume sont soigneusement expliqués et des exemples sont donnés qui permettent aux chercheurs de retrouver facilement l'ouvrage dont ils ont besoin. Ce livre rendra de grands services à tous les travailleurs qui auront à lire ou à traduire un ouvrage technique dans une langue étrangère.

H. T.

H. Erbring et F. Horst Muller. — *Kräfte und Strukturen bei Kolloiden.* 1 vol. IV + 174 p., 196 fig., Dietrich Steinkopff, édit., Darmstadt, 1954. Prix : D. M. : 26.

Comptes rendus du XVI^e Congrès sur les Colloïdes qui s'est tenu à Hambourg les 19 et 20 septembre 1953, et qui comprennent toutes les communications présentées et les discussions qui les ont suivies. Ce volume constitue le tome 16 des Comptes Rendus de la Kolloid Gesellschaft qui sont publiés dans le tome 136 de la Kolloid Zeitschrift.

H. T.

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 87

AHMED HADJI. — Voir REMLINGER (P.).	
ALIX (D.). — Voir DESBORDES (J.).	
ANDRAL (L.) et SÉRIÉ (Ch.). — Un cas de charbon bactérien chez le chien	738
ANDRIEU (G.), ENJALBERT (L.) et LAPCHINE (L.). — Streptocoques d'origine humaine. Etude de 217 souches. I. Caractères morphologiques. Action des antibiotiques. II. Propriétés sérologiques et biochimiques	555 et 617
ARBOUYS (S.), FINE (J.) et EYQUEM (A.). — Contribution à l'étude électrophorétique du sérum des rongeurs	169
AUBERT (J.-P.). — Voir LEMOIGNE (M.).	
AUDEBAUD (G.), GANZIN (M.), CECCALDI (J.) et MERVEILLE (P.). — Isolement d'un <i>Chromobacterium violaceum</i> à partir de lésions hépatiques observées chez un singe <i>Cercopithecus cephus</i>	413
— Voir LE MINOR (L.).	
BALDUCCI (D.), CURCIO (F.) et ROLLI (G.). — Action des adjuvants sur l'activité des vaccins contre le virus de Newcastle . .	471
BARJAC (H. DE). — La microflore dénitrifiante ; sa présence normale dans le sol	440
— et CHALVIGNAC (M.-A.). — Nouvel essai sur la détermination du pouvoir amylolytique	84
BARON (J.-B.). — Voir CABAU (N.).	
BASCOULERGUE (P.). — Voir LE MINOR (L.).	
BENACERRAF (B.). — Voir BIOZZI (G.).	
BENITO-TRUJILLO (M.). — Une nouvelle espèce microbienne pathogène pour le mouton, <i>Corynebacterium toxinogenes</i> . .	111
BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (C.). — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1953	287
BERTOYE (A.) et COURTIEU (A.-L.). — La différence de sensibilité à la streptomycine comme test de diagnostic bactériologique entre <i>C. diphtheriae</i> et <i>C. xerose</i>	479
— — et GILLY (R.). — L'« hémolyse en cocarde » déterminée par <i>H. pertussis</i> et <i>H. paraptussis</i> sur milieu de Bordet-Gengou	469
— Voir FAVRE (M.).	

- BEUMER (J.). — Influence de la composition du milieu de culture sur la production spontanée de phages par le bacille lysogène de Lisbonne 635
- BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.), GRUMBACH (F.), HALPERN (B.-N.), LEVADITI (J.) et RIST (N.). — Etude de l'activité granulopexique du système réticulo-endothélial au cours de l'infection tuberculeuse expérimentale de la souris 291
- BIZZINI (B.), DIGEON (M.) et RAYNAUD (M.). — Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique. III. Préparation d'une toxine soluble 724
- Voir RAYNAUD (M.).
- BONFILS (S.). — Voir GROS (F.).
- BOYDEN (S. V.) et GRABAR (P.). — Rôle des lipides dans la sensibilisation des érythrocytes par les constituants de la tuberculine 257
- BUCK (G.), QUESNEL (J. J.) et RAMAMBAZAFY. — Expériences d'inoculation du porc avec le virus de la maladie de Newcastle. 450
- BUTTIAUX (R.), OSTEUX (R.), FRESNOY (R.) et MORIAEZ (J.). — Les propriétés biochimiques caractéristiques du genre *Proteus*. Inclusion souhaitable du genre *Providencia* dans celui-ci. 375
- Voir MONNET (P.).
- CABAU (N.) et BARON (J.-B.). — Variation de la pigmentation et du test de Chapman chez le staphylocoque sous l'action du ³²P 458
- CAMAND (R.). — Voir JOUBERT (L.).
- CARAVEL (C.), DUCLOZ (J.) et GROULADE (J.). — Dispositif d'alimentation à courant constant pour électrophorèse sur papier. 227
- CARR (L. G. K.) et MACHEBOEUF (M.). — L'action de la pénicilline sur le métabolisme protidique dans les cellules proliférantes des bactéries. I et II 585 et 708
- CARRÈRE (L.) et ROUX (J.). — Recherche des *Brucella* dans le sang par inoculation à l'embryon de poulet 220
- — Activité phosphatasique des staphylocoques 349
- — Recherches sur la fièvre Q dans la région montpelliéraine. 460
- CASTELLANI (A.). — Observations sur une bactérie qui semble jouer un rôle important dans l'étiologie de nombreux cas d'ulcère varicosoïde 361
- CECCALDI (J.). — Voir AUDEBAUD (G.).
- CHABBERT (Y.), LE MINOR (S.), LE MINOR (L.) et NICOLLE (P.). — Etudes sur les *E. coli* isolés au cours de gastro-entérites infantiles. II. 175
- CHALVIGNAC (M.-A.). — Voir BARJAC (H. DE).
- COURTIEU (A.-L.). — Voir BERTOYE (A.).
- CURCIO (F.). — Voir BALDUCCI (D.).
- DAHMEN (M.) et MOUTSCHEN (J.). — Action de la gliotoxine et de la viridine sur les cultures de tissus végétaux 204

- DEINSE (F. VAN) et SÉNÉCHAL (F.). — Le BCG est-il virulent pour le hamster doré de Syrie? 117
- DELAUNAY (A.), GIRARD (O.), ROQUEFEUIL (C. DE) et KASPER (M. M.). — Modifications apportées par le salicylate de Na et des corps divers à la réaction de floculation antigène-anti-corps 510
- Voir LEBRUN (J.).
- DEOM (J.) et MORTELMANS (J.). — Sur la conservation en culture de *Trichomonas gallinae* 107
- DESBORDES (J.), FOURNIER (E.) et ALIX (D.). — Dissociation nouvelle du bacille tuberculeux. Constance ou variation du pouvoir pathogène des mycobactéries virulentes . . 223
- DIGEON (M.). — Voir BIZZINI (B.).
- DIVERNEAU (G.). — Voir NICOLLE (P.).
- DOBIJA (M.). — Voir FRAPPIER (A.).
- DROUHET (E.) et ZAPATER (R. C.). — Phase levure et phase filamenteuse du *Paracoccidioides brasiliensis*; étude des noyaux 396
- DUBOIS (R.). — Voir LECOCQ (E.).
- DUCLOZ (J.). — Voir CARAVEL (C.).
- ENJALBERT (L.). — Voir ANDRIEU (G.).
- EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). — Les groupes sanguins des chats 91
- et JOCHEM (E.). — Les groupes sanguins des cobayes . . 225
- Voir ARBOUYS (S.).
- Voir FINE (J.).
- Voir PODLIACHOUK (L.).
- FABIANI (G.) et ORFILA (J.). — Caractères généraux du paludisme expérimental de la souris blanche infectée par *Plasmodium berghei* 38
- FAVRE (M.), SÉDALLIAN (P.) et BERTOYE (A.). — Lésions provoquées par un virus d'origine méningitique, anormal par sa résistance, ses dimensions et sa répartition dans l'organisme . 714
- FINE (J.), EYQUEM (A.) et MAILLOUX (M.). — Les hétéro-hémagglutinines dans le règne animal 74
- Voir ARBOUYS (S.).
- FOSSAERT (H.). — Voir LE MINOR (L.).
- FOUACE (J.). — Voir WAHL (R.).
- FOURNIER (E.). — Voir DESBORDES (J.).
- FRAPPIER (A.), MARTINEAU (B.) et DOBIJA (M.). — Le nodule de surinfection et le degré de résistance en tuberculose expérimentale 131
- FRESNOY (R.). — Voir BUTTIAUX (R.).
- GAILLARD (C.). — Voir THIVOLET (J.).
- GANZIN (M.). — Voir AUDEBAUD (G.).
- GAUDIER (B.). — Voir TACQUET (A.).

- GENGOU (O.). — Contribution à l'étude de l'hémolyse par l'alexine de cobaye 241
- GEOFFROY (M.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- GERNEZ-RIEUX (Ch.). — Voir TACQUET (A.).
- GILLY (R.). — Voir BERTOYE (A.).
- GIRARD (H.). — Voir JOUBERT (L.).
— Voir MACKOWIAK (C.).
- GIRARD (O.). — Voir DELAUNAY (A.).
- GRABAR (P.). — BOYDEN (S. V.).
- GROS (F.) et BONFILS (S.). — Influence de la cortisone sur les teneurs du muscle et du foie en combinaisons phosphorées. 194
- GROULADE (J.). — Voir CARAVEL (C.).
- GRUMBACH (F.). — Voir BIOZZI (G.).
- GUILLAUMIE (M.), KREGUER (A.) et GEOFFROY (M.). — Diffusion de différentes toxines dans des sérums antigangréneux gélosés 522
— — — et READE (G.). — Activité de la toxine de *W. perfringens*. I. Titrages *in vitro* en présence de sérum humain ou d'émulsion de jaune d'œuf 46
- HALPERN (B.-N.). — Voir BIOZZI (G.).
- HILSONI (P.) et VERGE (J.). — Recherches sur le diagnostic allergique de la lymphangite épizootique du cheval par l'histoplasmine 737
- JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). — Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*E. coli*. I. Le système génétique du bactériophage 653
— Voir WOLLMAN (E. L.).
- JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — Essais comparatifs d'immunisation du rat blanc contre la brucellose expérimentale au moyen de vaccin vivant et de vaccin tué 152
— — Quelques considérations sur la brucellose du lièvre, à propos de huit cas identifiés en France 218
— TOUMANOFF (C.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). — Transmission expérimentale de la myxomatose au lapin par *Anopheles maculipennis atroparvus* et *A. stephensi* 477
— et VIRAT (B.). — La longévité des spores de *B. anthracis*. 215
- JOUBERT (L.), GIRARD (H.), MACKOWIAK (C.) et CAMAND (R.). — Recherches sur la fixation du complément dans la fièvre aphteuse 536
- KASPER (M. M.). — Voir DELAUNAY (A.).
- KRÉGUER (A.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- LAFFAILLE (A.). — Voir RELYVELD (E.-H.).
- LAGRUE (G.). — Voir SANDOR (G.).
- LANG (R.). — Voir MACKOWIAK (C.).
- LAPCHINE (L.). — ANDRIEU (G.).
- LAPIED (M^{lle}). — Voir TOUMANOFF (C.).

- LE BOT (Y.). — Voir SANDOR (G.).
- LEBRUN (J.) et DELAUNAY (A.). — Effet exercé *in vitro* par le salicylate de Na sur deux types de réactions antigène-anticorps : l'agglutination bactérienne et l'hémagglutination passive 387
- LECOCQ (E.), DUBOIS (R.) et LINZ (R.). — Effets de traitements discontinus à la streptomycine sur la multiplication *in vitro* de *M. tuberculosis* 141
- LEMÉTAYER (E.), RAYNAUD (M.), NICOL (L.) et TURPIN (A.). — Action préventive spécifique précoce de l'anatoxine tétanique employée à doses massives 1
- LE MINOR (L.) et FOSSAERT (H.). — Un nouveau type de *Salmonella* isolé au Venezuela 104
- LE MINOR (L.), MERVEILLE (P.), BASCOULERGUE (P.) et AUDEBAUD (G.). — Un nouveau type sérologique de *Salmonella* : 6,7 : b : 1,2. 105
— Voir CHABBERT (Y.).
— Voir MONNET (P.).
— Voir NÉEL (R.).
- LE MINOR (S.). — Voir CHABBERT (Y.).
— Voir MONNET (P.).
- LEMOIGNE (M.), AUBERT (J.-P.) et MILLET (J.). — La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose 427
- LEVADITI (J.). — Voir BIOZZI (G.).
- LINZ (R.). — Voir LECOCQ (E.).
- LINZENMEIER (G.). — Etude sérologique des corynébactéries anaérobies par la méthode des agglutinines 572
- LOZE (A.). — Voir TISON (F.).
- LUZZATI (D.). — Action des agents tensio-actifs sur le bacille de Koch. Fixation de l'oléate de sodium par les bactéries . . 101
- MACKOWIAK (C.), GIRARD (H.) et LANG (R.). — Procédés de conservation du virus aphteux de culture 465
— Voir JOUBERT (L.).
- MAILLOUX (M.). — Voir FINE (J.).
- MANCY-COURTILLET (D.) et PINNERT-SINDICO (S.). — Une nouvelle espèce de *Streptomyces*, *S. armillatus* 580
- MANGALO (R.). — Voir RAYNAUD (M.).
- MANIGault (P.). — Etude biochimique et histochimique des tumeurs du crown-gall chez *Pelargonium zonale*. III. Emploi de radio-isotopes 691
- MARIAT (F.). — Physiologie des actinomycètes aérobies pathogènes. II. La pyrimidine, facteur de croissance pour *Nocardia lutea* et *N. rubra* 233
- MARSELOU (U.) et SEGRETAIN (G.). — Action des antibiotiques *in vitro* sur la croissance des *Candida* 229
- MARTINEAU (B.). — Voir FRAPPIER (A.).

- MAZUREK (C.). — Nouvelles recherches sur l'actinomyose expérimentale 345
- MERVEILLE (P.). — Voir AUDEBAUD (G.).
— Voir LE MINOR (L.).
- MILLET (J.). — Voir LEMOIGNE (M.).
- MONNET (P.), BUTTIAUX (R.), PAPA VASSILIOU (J.), NICOLLE (P.) et LE MINOR (S. et L.). — *Escherichia coli* des types O 111 et O 55 dans les eaux d'alimentation 347
- MORIAMEZ (J.). — Voir BUTTIAUX (R.).
- MORTELMANS (J.). — Voir DEOM (J.).
- MOUTSCHEN (J.). — Voir DAHMEN (M.).
- MUTSAARS (W.). — Corrélation entre le nombre de germes et de plages de bactériophagie en milieu trypaflaviné 268
- NÉEL (R.), LE MINOR (L.) et TASLIMI (H.). — Les variations dans la fermentation des glucides par *S. gallinarum* et *S. pullorum*. 719
- NICOL (L.). — Voir LEMÉTAYER (E.).
- NICOLLE (P.), PAVLATOU (M.) et DIVERNEAU (G.). — Les lysotypies auxiliaires de *S. typhi*. I. Subdivision du type A et du groupe I + IV par une nouvelle série de phages 193
— Voir BUTTIAUX (R.).
— Voir CHABBERT (Y.).
- NILES (G. R.). — Voir SCHMID (E. E.).
- ORFILA (J.). — Voir FABIANI (G.).
- OSTEUX (R.). — Voir BUTTIAUX (R.).
- OYE (E. VAN). — Application des réactions de Dubos-Middlebrook et de Desbordes à *Mycobacterium ulcerans* 17
- PAPA VASSILIOU (J.). — Voir MONNET (P.).
- PARIS (C.). — Voir RELYVELD (E.-H.).
- PASQUIER (P. DU). — Etude de la résistance des *Salmonellae* à la chloromycétine 418
- PAVLATOU (M.). — Voir NICOLLE (P.).
- PEYRÉ (M.) et VELU (H.). — A propos de la framycétine. Titrage des antibiotiques dans les urines 94
- PILLET (J.). — Voir TURPIN (A.).
- PINNERT-SINDICO (S.). — Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques, *S. ambofaciens* n. sp. 702
— Voir MANCY-COURTILLET (D.).
- PLACIDI (L.). — Essai de transmission de la peste porcine au hérisson 109
— Transmission du virus de Newcastle au hérisson. 236
- PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). — Etude d'un antigène hétérophile commun aux globules rouges de certains chevaux et à *Neisseria meningitidis* 339
- PODLIACHOUK (L.). — Voir EYQUEM (A.).
- PRÉVOT (A.-R.) et THOUVENOT (H.). — Données nouvelles sur l'habitat et la cytologie de *Clostridium corallinum* 716

- QUESNEL (J. J.). — Voir BUCK (G.).
- RAMAMBAZAFY (D.). — Voir BUCK (G.).
- RAYNAUD (M.), TURPIN (A.), MANGALO (R.). et BIZZINI (B.). — Croissance et toxigenèse. I 599
- Voir BIZZINI (B.).
- Voir LEMÉTAYER (E.).
- Voir RELYVELD (E.-H.).
- Voir TURPIN (A.).
- READE (G.). — Voir GUILLAUMIE (M.).
- REBEYROTTE (P.) et SLIZEWICZ (P.). — Ultracentrifugation des cénospes lipoprotéiques 697
- RELYVELD (E.-H.), TURPIN (A.), LAFFAILLE (A.), PARIS (C.) et RAYNAUD (M.). — Purification de la toxine diphtérique. Contrôle qualitatif des fractions par la méthode de précipitation spécifique en gel 301
- Voir TURPIN (A.).
- REMLINGER et AHMED HADJI. — Inoculation du virus rabique Flury dans la chambre antérieure de l'œil du lapin. 334
- BAILLY (J.) et AHMED HADJI. — Inoculation du virus rabique Flury au singe 90
- RENOUX (G.). — Sur un milieu sélectif pour l'isolement de *Br. melitensis* 325
- RIST (N.). — Voir BIOZZI (G.).
- ROLI (G.). — Voir BALDUCCI (G.).
- ROQUEFEUIL (C. DE). — Voir DELAUNAY (A.).
- ROUX (J.). — Voir CARRÈRE (L.).
- SANDOR (G.), LAGRUE (G.) et LE BOT (Y.). — La fiche réticulo-endothéliale. VI. 314
- SCHMID (E. E.), VELAUDAPILLAI (T.) et NILES (G.-R.). — Un nouveau type de *Salmonella* (*S. colombo*) isolé à Ceylan. 106
- SÉDALLIAN (P.). Voir FAVRE (M.).
- SEGRETAIN (G.). — MARSELOU (U.).
- SÉNÉCHAL (F.). — Voir DEINSE (F. VAN).
- SERIÉ (Ch.). — Voir ANDRAL (L.).
- SLIZEWICZ (P.). — Voir REBEYROTTE (P.).
- SLONIMSKI (P.). — Sur l'inhibition de la croissance de la levure par le benzimidazol : mécanisme de la réversion de l'inhibition 404
- SOHIER (R.). — Voir TERRASSE (G.).
- SZTURM-RUBINSTEN (S.). Caractères sérologiques du mutant fermentant rapidement le lactose de *Sh. sonnei* 342
- TACQUET (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et GAUDIER (B.). — L'hydrolyse de l'urée par les mycobactéries 335
- TARBES (A.). — Voir THIVOLET (J.).
- TASLIMI (H.). — Voir NÉEL (R.).

- TERRASSE (G.) et SOHIER (R.). — Recherches sur l'activité antibiotique et « probiotique » de diverses corynébactéries non pathogènes à l'égard de *C. diphtheriae* 727
- THIVOLET (J.), TARBES (A.) et GAILLARD (C.). — Sur la reproductibilité de la réaction d'immobilisation du tréponème. Son intérêt pratique 462
- THOUVENOT (H.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- TISON (F.). — Signification des bacilles tuberculeux « apparemment morts » de certaines lésions du poumon 99
- Nouveau procédé d'isolement du B. K. dans les crachats. Usage du teepol dilué 735
- et LOZE (A.). — L'isolement du B. K. dans les crachats par les détergents 445
- TOUMANOFF (C.). — A propos d'un caractère différentiel de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago, agent de la flacherie des vers à soie 486
- et LAPIED (M^{lle}). — L'effet des antibiotiques sur les souches entomophytes ou non de *B. cereus* Frank et Frank 370
- Voir JACOTOT (H.).
- TURPIN (A.), RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E.-H.). — Concentration de diverses toxines et anatoxines par l'acide métaphosphorique 25
- RELYVELD (E.-H.), PILLET (J.) et RAYNAUD (M.). — Purification de la toxine et de l'anatoxine staphylococciques alpha 185
- Voir LEMÉTAYER (E.).
- Voir RAYNAUD (M.).
- Voir RELYVELD (E.-H.).
- VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (H.).
- VELAUDAPILLAI (T.). — Voir SCHMID (E.-E.).
- VELU (H.). — Voir PEYRÉ (M.).
- VERGE (J.). — Voir HILSONT (P.).
- VIALAT (C.). — Voir BÉQUIGNON (R.).
- VIALIER (J.). — Isolement de mycobactéries non pathogènes par cultures de l'expectoration des tuberculeux pulmonaires. 732
- VIRAT (B.). — Voir JACOTOT (H.).
- WAHL (R.). — Le pouvoir anti-infectieux chez les souris des préparations de phages activés sur *S. enteritidis* var. Danysz et *S. typhi murium* et ses relations avec leur « efficacité » *in vitro* 61
- et FOUACE (J.). — A propos des techniques d'identification des staphylocoques pathogènes par les phages. I et II 159 et 279
- WOLLMAN (E.-L.) et JACOB (F.). — Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*E. coli*. II. Mécanisme de la recombinaison génétique 674
- Voir JACOB (F.).
- ZAPATER (R. C.). — Voir DROUHET (E.).

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 87

<i>Actinomycètes</i> . — La pyrimidine, facteur de croissance pour	
<i>Nocardia lutea</i> et <i>N. rubra</i>	233
<i>Actinomycose</i> . Nouvelles recherches sur l' — expérimentale . . .	345
<i>Adjuvants</i> . Action des — sur l'activité des vaccins contre le virus	
de Newcastle	471
<i>Alexine</i> . Voir <i>Hémolyse</i> .	
<i>Anaérobies</i> . Habitat et cytologie de <i>Clostridium corallinum</i> . . .	716
<i>Anatoxine</i> . Action préventive spécifique précoce de l' — tétanique.	1
— Voir aussi <i>Toxines</i> .	
<i>Antibiotiques</i> . A propos de la framycétine. Titrage des antibio-	
tiques dans les urines	94
— Action des — <i>in vitro</i> sur la croissance des <i>Candida</i>	229
— L'effet des — sur les souches entomophytes ou non de <i>B. cereus</i> .	370
— Voir aussi <i>Corynébactéries</i> , <i>E. coli</i> et aux différents antibio-	
tiques.	
<i>Antigènes</i> . Etude d'un — hétérophile commun aux globules	
rouges de certains chevaux et à <i>Neisseria meningitidis</i> . . .	339
<i>BCG</i> . Le — est-il virulent pour le hamster de Syrie ?	117
<i>Bacille de Lisbonne</i> . Voir <i>Bactériophage</i> .	
<i>Bacille tuberculeux</i> . Signification des — — « apparemment	
morts » de certaines lésions du poumon	99
— Action des agents tensio-actifs sur le — —	101
— Effet de traitements discontinus à la streptomycine sur la	
multiplication <i>in vitro</i> du — —	141
— Dissociation nouvelle du — —. Constance ou variation du	
pouvoir pathogène des mycobactéries virulentes	223
— Isolement du — — dans les crachats par les détergents . . .	445
— Nouveau procédé d'isolement du — — dans les crachats, usage	
du teepol	735
<i>Bacille typhique</i> . Préparation d'une toxine R2 soluble	724
<i>Bacillus anthracis</i> . Longévité des spores de — —	215
<i>Bacillus cereus</i> . Caractère différentiel de — — var. <i>alesti</i> . . .	486
— Voir aussi <i>Antibiotiques</i> .	
<i>Bactériophage</i> . Le pouvoir anti-infectieux chez les souris des pré-	
parations de — activés sur <i>S. enteritidis</i> et <i>S. typhi murium</i> et	
ses relations avec leur « efficacité » <i>in vitro</i>	61
— Les techniques d'identification des staphylocoques pathogènes	
par les —. I. Opérations préliminaires et identification. . .	159

II. Choix d'une méthode de dilution des phages. Etude des fausses réactions	279
— Corrélation entre le nombre de germes et de plages de bactériophagie en milieu trypaflaviné	268
— Etude génétique d'un — tempéré. I et II	653 et 674
— Influence de la composition du milieu sur la production de — par le bacille lysogène de Lisbonne	635
— Voir aussi <i>Salmonella</i> .	
<i>Benzimidazol</i> . Voir <i>Levure</i> .	
<i>Brucellose</i> . Immunisation comparée du rat blanc au moyen de vaccin vivant et de vaccin tué	152
— A propos de huit cas de — du lièvre identifiés en France	218
— Recherche des <i>Brucella</i> dans le sang par inoculation à l'embryon de poulet	220
— Milieu sélectif pour l'isolement de <i>Br. melitensis</i>	325
<i>Candida</i> . Voir <i>Antibiotiques</i> .	
<i>Cénapses</i> . Ultracentrifugation des — lipoprotéiques	697
<i>Champignons</i> . Phase levure et phase filamenteuse de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ; étude des noyaux	396
<i>Charbon</i> . Un cas de — bactéridien chez le chien	738
<i>Chloromycétine</i> . Résistance des <i>Salmonellae</i> à la —	418
<i>Chromobacterium violaceum</i> . Isolement d'un — — à partir de lésions hépatiques observées chez un singe	413
<i>Corynébactéries</i> . Nouvelle espèce microbienne pathogène pour le mouton: <i>Corynebacterium toxinogenes</i>	111
— Etude sérologique des — anaérobies par la méthode des agglutinines	572
— Activité antibiotique et probiotique de diverses — non pathogènes à l'égard de <i>C. diphtheriae</i>	727
— Voir aussi <i>Streptomycine</i> .	
<i>Cortisone</i> . Influence de la — sur les teneurs du muscle et du foie en combinaisons phosphorées	194
<i>Cultures de tissus</i> . Action de la gliotoxine et de la viridine sur les — — — végétaux	204
<i>Electrophorèse</i> . Dispositif d'alimentation à courant constant pour — sur papier	227
— Voir aussi <i>Sérum</i> .	
<i>Détergents</i> . Voir <i>Bacille tuberculeux</i> .	
<i>Escherichia coli</i> . Sensibilité aux antibiotiques des — — isolés au cours de gastro-entérites infantiles	175
— — des types 0111 et 055 dans des eaux d'alimentation	347
<i>Fiche réticulo-endothéliale</i> . La — — — VI. Le point de vue quantitatif et le problème des sérogrammes	314
<i>Fièvre aphteuse</i> . La réaction de fixation du complément dans la — — —	536

<i>Fièvre Q.</i> La — — dans la région montpelliéraine	460
<i>Groupe sanguins.</i> Les — — des chats	91
— — Les — — des cobayes	225
<i>Hémagglutinines.</i> Les hétéro- — dans le règne animal	74
<i>Hémolyse.</i> Etude de l'— par l'alexine de cobaye	241
— L'— « en cocarde » déterminée par <i>H. pertussis</i> et <i>H. parapertussis</i>	469
<i>Levure.</i> Inhibition de la croissance de la — par le benzimidazol	404
— Production d'alcool et rendement de croissance de la — de boulangerie en aérobiose	427
<i>Lymphangite épizootique.</i> Le diagnostic allergique de la — — du cheval par l'histoplasmine	737
<i>Lysotypie.</i> Voir <i>Salmonella</i> .	
<i>Méningite.</i> Voir <i>Virus</i> .	
<i>Métabolisme.</i> Action de la pénicilline sur le — protidique dans les cellules proliférantes des bactéries. I et II.	585 et 708
<i>Mycobactéries.</i> Application des réactions de Dubos-Middlebrook et de Desbordes à <i>Mycobacterium ulcerans</i>	97
— L'hydrolyse de l'urée par les —	335
— Isolement de — non pathogènes par culture de l'expectoration des tuberculeux pulmonaires	732
<i>Myxomatose.</i> Transmission expérimentale de la — au lapin par <i>A. maculipennis atroparvus</i> et <i>A. stephensi</i>	477
<i>Newcastle.</i> Transmission du virus de — au hérisson	236
— Inoculation du porc avec le virus de —	450
— Voir aussi <i>Adjuvants</i> .	
<i>Paludisme.</i> Caractères généraux du — expérimental de la souris blanche infectée par <i>Plasmodium berghei</i>	38
<i>Pénicilline.</i> Voir <i>Métabolisme</i> .	
<i>Peste porcine.</i> Essai de transmission de la — — au hérisson	109
<i>Proteus.</i> Propriétés chimiques du genre —. Inclusion souhaitable des <i>Providencia</i> dans celui-ci	375
<i>Providencia.</i> Voir <i>Proteus</i> .	
<i>Rage.</i> Inoculation du virus Flury au singe	90
— Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1953	287
— Inoculation du virus Flury dans la chambre antérieure de l'œil du lapin	334
<i>Réactions antigène-anticorps.</i> Voir <i>Salicylate de Na</i> .	
<i>Salicylate de Na.</i> Effet exercé <i>in vitro</i> par le — — sur deux types de réactions antigène-anticorps	387
— — — Modifications apportées par le — — — et des corps divers à la réaction de floculation antigène-anticorps	510
<i>Salmonella.</i> Nouveau type de — isolé au Venezuela	104
— Nouveau type de — ; 6,7 : b : 1,2	105
— Nouveau type de — isolé à Ceylan.	106
— Les lysotypies auxiliaires de — <i>typhi</i>	493

— Variations dans la fermentation des glucides par — <i>gallinarum</i> et — <i>pullorum</i>	719
— Voir aussi <i>Bacille typhique</i> , <i>Chloromycétine</i> .	
<i>Sérum</i> . Etude électrophorétique du — des rongeurs	169
<i>Shigella</i> . Caractères sérologiques du mutant fermentant rapide- ment le lactose de — <i>sonnei</i>	342
<i>Sol</i> . Détermination du pouvoir amylolytique des —	84
— La microflore dénitrifiante du —	440
<i>Staphylocoque</i> . Activité phosphatasique des —	349
— Variations de la pigmentation et du test de Chapman chez le — sous l'action du ^{32}P	458
<i>Streptocoques</i> . — d'origine humaine. Etude de 217 souches. I. Caractères morphologiques et action des antibiotiques. II. Pro- priétés sérologiques et biochimiques	555 et 617
<i>Streptomyces</i> . Nouvelle espèce de —, <i>S. armillatus</i>	580
— Nouvelle espèce de —, <i>S. ambofaciens</i> , n. sp.	702
<i>Streptomycine</i> . La différence de sensibilité à la — comme test de diagnostic bactériologique entre <i>C. diphtheriae</i> et <i>C. xerose</i>	470
— Voir aussi <i>Bacille tuberculeux</i> .	
<i>Toxines</i> . Concentration de diverses — et anatoxines par l'acide métaphosphorique	25
— Activité de la — <i>perfringens</i> . Titrages <i>in vitro</i>	46
— Purification de la — et de l'anatoxine staphylococciques alpha.	185
— Purification de la — diphtérique. Contrôle qualitatif des fractions	301
— Diffusion de différentes — dans des sérums anti-gangréneux gélifiés	522
— Croissance et toxinogénèse	599
— Voir aussi <i>Bacille typhique</i> .	
<i>Tréponème</i> . Reproductibilité de la réaction d'immobilisation du —	462
<i>Trichomonas</i> . La conservation en culture de — <i>gallinae</i>	107
<i>Tuberculine</i> . Rôle des lipides dans la sensibilisation des érythro- cytes par les constituants de la —	257
<i>Tuberculose</i> . Le nodule de surinfection et le degré de résistance en — expérimentale	131
— Activité granulopexique du SRE au cours de la — expérimen- tale de la souris	291
<i>Tumeurs</i> . Etude biochimique et histochimique des tumeurs du crown-gall au moyen des radio-isotopes	691
<i>Ulcère varicosoïde</i> . Bactérie qui semble jouer un rôle important dans l'étiologie de l'—	361
<i>Vers à soie</i> . Voir <i>Bacillus cereus</i> .	
<i>Virus</i> . Conservation du — aphteux de culture	465
— d'origine méningitique, anormal par certains caractères	714
— Voir aussi aux différents virus.	

Le Gérant : G. MASSON.